

(19)

Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 0 831 327 A1

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
25.03.1998 Patentblatt 1998/13

(51) Int. Cl.⁶: G01N 31/22, G01N 33/52,
C12Q 1/26, C07D 241/38,
C07D 401/14

(21) Anmeldenummer: 97116653.3

(22) Anmeldetag: 24.09.1997

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC
NL PT SE
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV RO SI

- Josel, Hans-Peter, Dr.
82362 Weilheim (DE)
- Junius-Comer, Martina, Dr.
82327 Tutzing (DE)
- Merdes, Hartmut, Dr.
69123 Heidelberg (DE)
- Schmidt, Axel, Dr.
80634 München (DE)
- Selbertinger, Ernst, Dr.
81675 München (DE)

(30) Priorität: 24.09.1996 DE 19639169

(71) Anmelder:
Boehringer Mannheim GmbH
68305 Mannheim-Waldhof (DE)

(74) Vertreter:
Weiss, Wolfgang, Dipl.-Chem. Dr. et al
Patentanwälte
Weickmann & Partner,
Kopernikusstrasse 9
81679 München (DE)

(72) Erfinder:

- Heindl, Dieter, Dr.
82327 Tutzing (DE)
- Herrmann, Rupert, Dr.
82362 Weilheim (DE)
- Hönes, Joachim, Dr.
64673 Zwingenberg (DE)

(54) Redoxaktive Verbindungen und deren Anwendung

(57) Die Erfindung betrifft die Verwendung von redoxaktiven Verbindungen zur Herstellung von Nachweisreagenzien für ein Verfahren zur Bestimmung eines Analyten sowie Reagenzienkits, die diese redoxaktiven Verbindungen enthalten. Weiterhin werden neue redoxaktive Verbindungen offenbart.

EP 0 831 327 A1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft die Verwendung von redoxaktiven Verbindungen zur Herstellung von Nachweisreagenzien für ein Verfahren zur Bestimmung eines Analyten sowie Reagenzienkits, die diese redoxaktiven Verbindungen enthalten.

- 5 Weiterhin werden neue redoxaktive Verbindungen offenbart.

Redoxreaktionen ermöglichen den Nachweis und die Bestimmung von Analyten in verschiedenen Probenmaterialien. Hierbei wirkt ein oxidierendes oder reduzierendes System direkt oder über einen Mediator auf einen Redoxindikator ein. Die Anwesenheit des Analyten führt zu einer Reduktion oder Oxidation des Redoxindikators. Verwendet man geeignete Redoxindikatoren, bei denen durch Reduktion oder Oxidation eine nachweisbare Änderung der Molekülengenschaften erfolgt, kann ein qualitativer und/oder quantitativer Nachweis des zu bestimmenden Analyten erfolgen.

- 10 genschaften erfolgt, kann ein qualitativer und/oder quantitativer

Die Bestimmung eines Analyten kann beispielsweise durch ein colorimetrisches Nachweisverfahren, bei dem sich die Farbe des Nachweisreagens durch Oxidation oder Reduktion verändert, oder durch ein elektrochemisches Nachweisverfahren erfolgen. Beispiele für colorimetrische Nachweisreagenzien sind Resazurine, Heteropolysäuren (EP-B-0 431 456), Tetrazoliumverbindungen (EP-B-0 574 769), nitrosoaromatische Verbindungen (EP-A-0 620 283), RIND-Verbindungen, d.h. Verbindungen, die bei Reduktion eine intramolekulare Reaktion eingehen (vgl. z.B. EP-A-0 190 740 und WO86/04681). Beispiele für redoxaktive Verbindungen bei elektrochemischen Nachweisverfahren sind Nitrosoaromatien, Phenaziniumsalze, Kaliumhexacyanoferrate und Benzochinone (vgl. z.B. EP-A-0 441 222 und EP-A-0 505 494).

- Die aus dem Stand der Technik bekannten colorimetrischen

auf. So zeigen Tetrazoliumsalze eine ausgeprägte Lichtinstabilität. Weiterhin wird durch Reduktion die Salzstruktur zerstört und die resultierenden Formazane sind meist in Wasser unlöslich (H.-J. Guder, Indigo/Tetrazolium Dyes, Kapitel 12.1 in: Non radioactive labeling and detection of biomolecules, C. Kessler, Hrsg., Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1992). Bei Resazurinen ist der Farbunterschied zwischen oxidiertener und reduzierter Form für manche Anwendungen zu gering. Heteropolysäuren zeigen aufgrund einer geringen Extinktion und einer ungünstigen Absorptionswellenlänge der reduzierten Form für viele Anwendungen eine nicht ausreichende Sensitivität und sind darüberhinaus hinsichtlich der Absorptionswellenlänge der reduzierten Form wenig variabel. RIND-Verbindungen sind für diagnostische Tests oftmals zu reaktionsträge. Nitrosoaromaten wiederum sind sehr störfähig und der gebildete Farbstoff kann durch eine Überreduktion verblassen.

- Die der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufg

als Nachweisreagenzien zur Bestimmung von Analyten bereitzustellen, bei denen die Nachteile des Standes der Technik mindestens teilweise beseitigt sind. Die neuen redoxaktiven Verbindungen sollen einerseits hinsichtlich ihrer nachweisbaren Moleküleigenschaften eine hohe Variabilität besitzen und andererseits sowohl in der reduzierten als auch in der oxidierten Form ausreichend stabil sein.

- Die erfindungsgemäße Lösung dieser Aufgabe besteht darin,

zinischen Diagnostik bisher nicht verwendetes Redoxpaar einzusetzen, das eine Benzochinoxalindion-Substruktur oder Varianten dieser Substruktur enthält, wie z.B. eine Dehydroindanthron- oder Benzonaphthophenazindion-Substruktur. Dehydroindanthrene sind seit langem bekannte Zwischenstufen bei der Synthese von Anthrachinonfarbstoffen wie z.B. halogenierten Indantronen. Mehrere Vertreter dieser Substanzklasse sind beispielsweise in der Monographienreihe "The Chemistry of Heterocyclic Compounds", Band "Phenazines", G.A. Swan und D.G.I. Felton, 1975 Interscience Publishers Inc., New York, insbesondere pp 431 - 433, 469 und 477, beschrieben. Auch die Herstellung von sulfonierten Derivaten ist bekannt (vgl. beispielsweise deutsches Patent Nr. 129847 vom 10. Mai 1901 und deutsches Patent Nr. 216891 vom 13. Dezember 1908).

- Verbindungen mit Benzochinoxalin-Substruktur wie z.B.

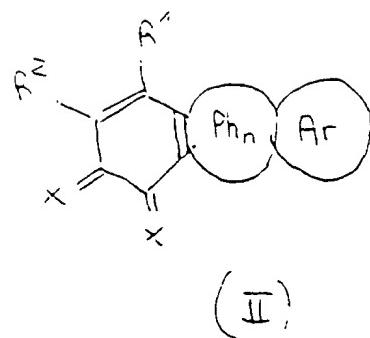
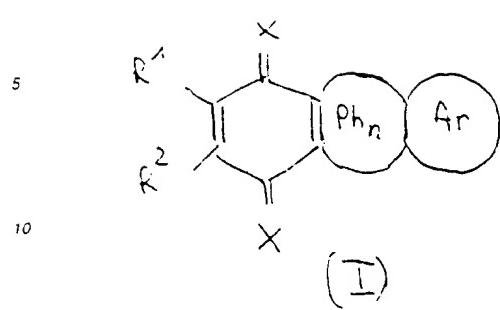
h]phenazin-8,13-dion und Varianten mit weiteren ankondensierten Arylresten und deren chemische Reduktion zu Farbstoffen sind ebenfalls seit langem bekannt (siehe "Phenazines", Supra).

- Obwohl Redoxpaare mit Benzochinoxalindion-Substruk

bisher keine Anwendung in der medizinischen Diagnostik bzw. biochemischen Analytik. Überraschenderweise wurde jetzt festgestellt, daß diese Substanzen hervorragend als Nachweisreagenzien insbesondere für colorimetrische Nachweisverfahren geeignet sind. So besitzen sie sowohl im reduzierten als auch im oxidierten Zustand eine hohe Lichtstabilität und können darüberhinaus hinsichtlich der Eigenschaften wie Löslichkeit, Lage der Absorptionsmaxima von oxidiertem und reduziertem Form, Redoxpotential usw. durch gezielte Einführung von Substituenten, z.B. hydrophiler Reste, Elektronendonator- oder -akzeptorreste stark variiert werden. Dies ermöglicht ein breites Anwendungsfeld, wie z.B. im Teststreifen oder Flüssigkeitstest. Darüberhinaus ist auch der Einsatz als Mediatoren bei colorimetrischen und elektrochemischen Anwendungen möglich.

- 55 Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit

oder/und II oder Salzen davon als Nachweisreagenzien oder zur Herstellung von Nachweisreagenzien für ein Verfahren zur Bestimmung eines Analyten:



- worin R¹ und R² jeweils unabhängig voneinander Wasserstoff, Halogene oder organische Reste sind,
X O, S, C(Acc)₂, CH(Acc) oder N(Acc) bedeutet und Acc eine elektronenziehende Gruppe ist,
- 20 Ph einen gegebenenfalls substituierten Phenylring bedeutet,
- n eine ganze Zahl von 0 bis 4 ist und
- Ar eine Gruppe der Strukturformeln IIIa, IIIb, IVa, IVb, Va, Vb, VIa oder VIb bedeutet:

25

30

35

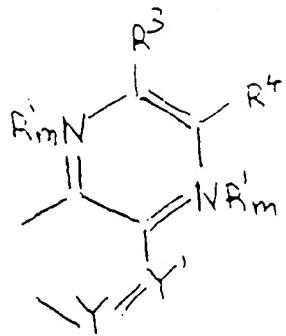
40

45

50

55

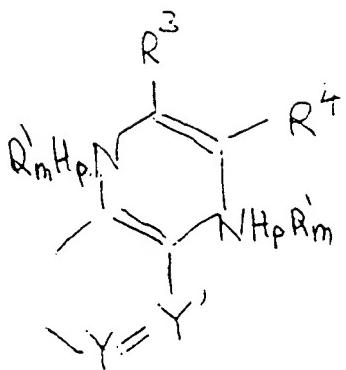
5



15

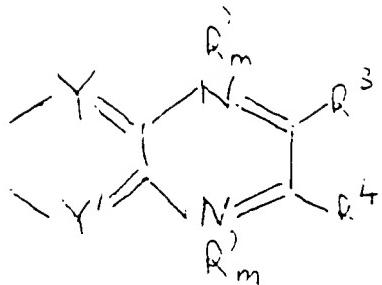
(IIIa)

20



(IIIb)

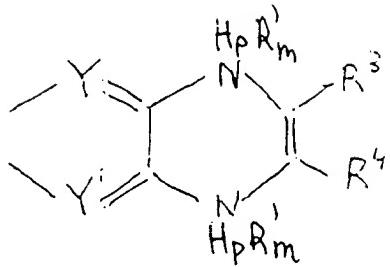
25



30

(IVa)

40



(IVb)

45

50

55

5

10

15

20

25

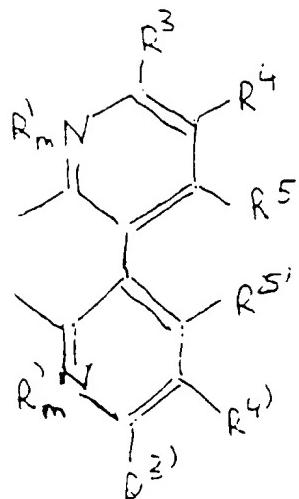
30

35

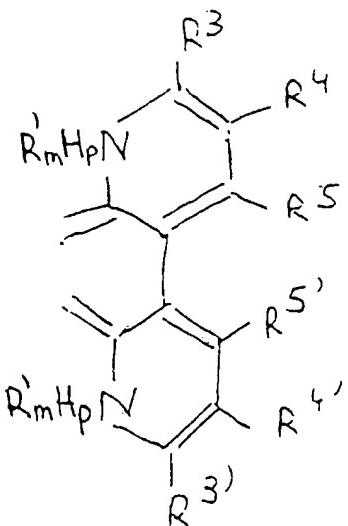
40

45

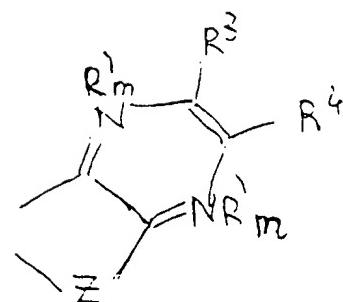
50



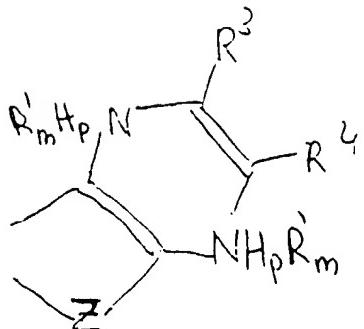
(VIa)



(VIb)



(VIa)



(VIb)

worin

55

R³, R^{3'}, R⁴, R^{4'}, R⁵ und R^{5'} jeweils unabhängig voneinander Wasserstoff, Halogen und organische Reste sind,

Y und Y' jeweils unabhängig voneinander N oder CR⁶ sind, wobei R⁶ Wasserstoff, Halogen oder ein organischer Rest ist.

EP 0 831 327 A1

- Z NR, O oder S ist, wobei R ein organischer Rest oder Wasserstoff ist.
R' jeweils unabhängig ein gegebenenfalls substituierter Alkyl- oder Arylrest ist und
m jeweils unabhängig 0 oder 1 ist, wobei, wenn m gleich 1 ist, in den Strukturformeln (IIIa), (IVa), (Va) und (Vla)
ein an R' gebundener Stickstoff eine positive Ladung trägt und ein entsprechendes Gegenion vorhanden ist,
5 und in den Strukturformeln (IIlb), (IVb), (Vb) und (Vlb) p gleich 0 ist und wobei, wenn m gleich 0 ist, p gleich
1 ist.

Neben den Verbindungen der Strukturformeln I und II können auch Salze dieser Verbindungen, z.B. saure Additionsalze, verwendet werden. Beispiele für geeignete Gegenionen für solche Salze oder für geladene Verbindungen mit
10 einem oder mehreren Resten R' sind Halogenide, BF_4^- , PF_6^- , ClO_4^- oder organische Anionen wie Acetat. Vorzugsweise enthalten geladene Verbindungen nur einen Rest R'.

In den Verbindungen der Strukturformeln I und II umfaßt vorzugsweise zumindest einer der Reste R¹ und R² ein aromatisches oder heteroaromatisches Ringsystem, das gegebenenfalls Substituenten wie etwa z.B. geradkettige, verzweigte, gesättigte oder ungesättigte Kohlenwasserstoffreste, die gegebenenfalls Heteroatome enthalten können, z.B.
15 Alkylreste wie etwa C₁-C₄-Alkyl- oder Haloalkylreste, Hydroxyalkylreste wie etwa C₁-C₄-Hydroxyalkylreste, Halogenatome z.B. F, Cl, Br, I oder/und hydrophile Gruppen - wie im folgenden definiert - tragen kann. Mehrere Substituenten an aromatischen Ringen können auch miteinander, z.B. über Alkylenbrücken, verbrückt sein. R¹ und R² können auch
20 miteinander verbrückt sein. Besonders bevorzugt bilden R¹ und R² zusammen ein aromatisches oder heteroaromatisches Ringsystem, z.B. einen gegebenenfalls substituierten Benzolring. Weiterhin ist möglich, daß R¹ und R² zusammen eine weitere Ph_n-Ar-Gruppe bilden.

Der Rest X in den Formeln I und II ist vorzugsweise O, C(Acc)₂, CH(Acc) oder N(Acc). Acc ist ein elektronenziehender Substituent, d.h. ein Substituent mit einem positiven Hammett-Sigmawert (vgl. z.B. Steric Effects in Organic Chemistry, John Wiley and Sons, Inc. 1956, pp. 570-574 und Progress in Physical Organic Chemistry, Vol. 2, Interscience Publishers, 1964, pp. 333-339). Spezifische Beispiele für solche Substituenten sind Cyano, Carboxy, Nitro, Halogen,
25 Trihalogenmethyl, Carbonyl, Carbamoyl, Sulfonyl, Sulfamoyl, Estergruppen etc. Bevorzugt sind Cyano, Nitro und Estergruppen, insbesondere Cyano und Nitro.

Ph bedeutet einen gegebenenfalls substituierten Phenylring, wobei die Substituenten beispielsweise Halogen, Alkyl oder/und Hydroxyalkyl (siehe oben) sein können. Vorzugsweise ist n eine ganze Zahl von 0 bis 1. Wenn n gleich 0 ist, hat eine Verbindung der Strukturformel I vorzugsweise ein Grundgerüst, wie es in den Verbindungen 1 und 2 in
30 Figur 1 dargestellt ist. Die Verbindung 1 kann dabei als Naphthochinonderivat aufgefaßt werden, bei dem zwei Stickstoffatome als Substituenten an Positionen 5 und 6 des Ringsystems lokalisiert sind. Varianten dieser Strukturen stellen die Verbindungen 3 und 4 in Figur 1 dar. Dort befinden sich die Stickstoffatome an den Positionen 5 und 8 (Verbindung 3) bzw. 6 und 7 (Verbindung 4) des Naphthochinonringsystems.

Eine phenoxy Variante der Verbindung 1 (n = 1) ist Verbindung 5 in Figur 1. Ein Grundgerüst für eine Verbindung
35 der allgemeinen Strukturformel II ist die in Figur 1 dargestellte Verbindung 6.

Die Verbindungen 7 und 8 in Figur 1 sind einfach bzw. zweifach alkylierte Varianten von Verbindung 1. Der Rest R' ist ein gegebenenfalls substituiertes Alkyl, vorzugsweise ein C₁-C₄- und besonders bevorzugt ein C₁-C₂-Alkylrest oder ein gegebenenfalls substituierter Arylrest, vorzugsweise ein Phenylrest.

Die Gruppen der Strukturformeln IIIa und IIIb, IVa und IVb, Va und Vb, Vla und Vlb stellen jeweils die oxidierte bzw.
40 reduzierte Variante einer Verbindung dar. In diesen Gruppen umfaßt zumindest einer der Reste R³, R⁴ und - sofern vorhanden - R⁵, R⁶, R⁷ und R⁸ ein aromatisches oder heteroaromatisches Ringsystem, das gegebenenfalls - entsprechend R¹ und R² - substituiert sein kann. In den Gruppen der Strukturformeln IIIa, IIIb, IVa, IVb, Vla und Vlb können R³ und R⁴ miteinander verbrückt sein. Vorzugsweise bilden sie zusammen ein Ringsystem, das zumindest teilweise eine aromatische oder heteroaromatische Struktur aufweist. Ebenfalls ist bevorzugt, wenn einer oder mehrere der Reste, z.B. R³ und R⁴, einzeln ein aromatisches und insbesondere ein heteroaromatisches Ringsystem, z.B. einen Pyridinring enthalten.

In den Gruppen der Strukturformeln Va und Vb können (a) R³ und R⁴ oder/und R⁵ und R⁶ oder (b) R⁴ und R⁵ oder/und R⁷ und R⁸ jeweils miteinander verbrückt sein. Vorzugsweise bilden sie ein Ringsystem, das zumindest teilweise eine aromatische oder heteroaromatische Struktur aufweist. Besonders bevorzugt bilden die Reste jeweils zusammen ein gegebenenfalls substituiertes Naphthalin- oder Anthrachinonringsystem. Andererseits können auch einer oder mehrere der Reste einzeln ein aromatisches oder heteroaromatisches Ringsystem enthalten.

Ein großer Vorteil der erfindungsgemäßen Verbindungen ist, daß durch eine fast beliebige Substituentenvariation die Eigenschaften einzelner Verbindungen, z.B. die spektrometrischen Eigenschaften wie Lage der Absorptionsmaxima, die elektrochemischen Eigenschaften oder die Löslichkeitseigenschaften, stark variiert werden können. Bevorzugt enthalten die Verbindungen zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit eine oder mehrere hydrophile Gruppen, z.B. Ladungsträger, die vorzugsweise ausgewählt sind aus (a) Carbonsäure-, Sulfonsäure- und Phosphonsäuregruppen sowie davon abgeleiteten Salzen, z.B. Ammonium- oder Alkalimetallsalzen, (b) Schwefelsäuremonoester-, Phosphorsäuremonoester- und Phosphorsäurediestergruppen sowie davon abgeleiteten Salzen, (c) und primären, sekundären

oder tertiären Amingruppen sowie quaternären Ammoniumgruppen, insbesondere tertiären Amingruppen und quaternären Ammoniumgruppen. Andererseits können die hydrophilen Gruppen auch nichtionische Gruppen sein wie etwa (d) Polyhydroxygruppen, z.B. die Reste eines mehrwertigen Alkohols, eines mehrwertigen Aminoalkohols, z.B. Tris, oder eines Mono-, Oligo- oder Polysaccharids, und (e) C₂-C₃ Polyalkylenoxy- oder C₂-C₃-Polyalkylthiogruppen.

5 Besonders bevorzugt sind Sulfonsäure- und Amingruppen. Weiterhin können die hydrophilen Gruppen auch eine Kombination von zwei oder mehr der Gruppen (a) - (e) enthalten.

Weiterhin ist es möglich, die Verbindungen der Strukturformel (I) oder/und (II) in Form von Metallkomplexen einzusetzen. Beispiele für geeignete Metalle sind Übergangsmetalle oder Seltenerdmetalle.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen kann nach an sich bekannten Methoden erfolgen. So können 10 sulfonierte Dehydroindanthrone durch Sulfonierung von Indanthrenen und anschließende Oxidation erhalten werden. Die Kondensation von Ortho-Chinonen mit Ortho-Diaminoarylverbindungen zu Phenazinen ist eine gängige Reaktion (vgl. G.A.Swan in "The Chemistry of Heterocyclic Compounds: Phenazines, HRSG.A. Weissberger, Interscience Publisher Inc., New York 1975). Die Herstellung von Verbindungen, worin Ar eine Gruppe der Strukturformel (Va) oder (Vb) bedeutet, durch eine Wittig-Reaktion ist beispielsweise in einer Veröffentlichung von Nicolaides und Litinas 15 (J.Chem.Res. (M) 1983, 658-663) beschrieben.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen werden zur Herstellung von Nachweisreagenzien für Verfahren zur qualitativen oder/und quantitativen Bestimmung eines Analyten eingesetzt. Diese Bestimmung kann in wässrigen Flüssigkeiten, z.B. Proben von Körperflüssigkeiten wie etwa Blut, Serum, Plasma oder Urin, Abwasserproben oder Lebensmitteln, durchgeführt werden. Das Verfahren kann sowohl als Naßtest z.B. in einer Küvette oder als Trockentest 20 auf einem entsprechenden Reagenzträger durchgeführt werden.

Die Bestimmung der Analyten kann über eine einzige Reaktion oder durch eine Sequenz von Reaktionen erfolgen. Vorzugsweise umfaßt die Bestimmung des Analyten eine Redoxreaktion, wobei eine nachweisbare Änderung der Moleküleigenschaften der erfindungsgemäßen Nachweisreagenzien, z.B. eine Änderung der spektroskopischen Eigenschaften wie etwa Absorption oder Fluoreszenz, oder eine Änderung der elektrochemischen Eigenschaften 25 erfolgt.

Besonders bevorzugt erfolgt eine Bestimmung der Änderung von Absorptionseigenschaften, die durch spektroskopische Nachweisverfahren in IR-, UV- und insbesondere im sichtbaren Bereich erfolgen kann. Überraschenderweise wurde festgestellt, daß durch Einführung von hydrophilen Gruppen wie etwa Sulfonsäuregruppen die reduzierte Form der erfindungsgemäßen Verbindungen ihr Absorptionsmaximum im langwelligen Bereich von etwa 600 bis 800 nm 30 haben, so daß bei der Bestimmung von Analyten in Serum keine Störungen durch Serumbestandteile auftreten. Dies gilt insbesondere für Gruppen der Strukturformel (III), wobei R³ und R⁴ zusammen ein Naphthalinringssystem bilden und die hydrophilen Gruppen, z.B. Sulfonsäuregruppen, an ein C-Atom gebunden sind, das direkt einem Pyrazin-Stickstoff benachbart ist.

Neben spektrometrischen Eigenschaften können auch elektrochemische Eigenschaften der Nachweisreagenzien bestimmt werden, z.B. Änderungen im Redoxpotential oder im Stromfluß. Beispiele für geeignete elektrochemische Nachweisverfahren sind die Cyclovoltammetrie und die Amperometrie.

Die Analyten, deren Bestimmung durch die erfindungsgemäßen Nachweisreagenzien erfolgt, können beispielsweise Zellen, z.B. Bakterien, Hefen, Pilze, Pflanzenzellen oder Tierzellen wie etwa Leukozyten sein, wobei insbesondere reduzierende oder oxidierende Aktivitäten dieser Zellen nachgewiesen werden können. Weiterhin können 40 Enzyme, z.B. Oxidoreduktasen wie etwa Oxidasen, z.B. Peroxidase, oder Dehydrogenasen, z.B. Glucoseoxidase, Lactat-Dehydrogenase, oder Hydrolasen, z.B. Lipase, Galactosidase, alkalische Phosphatase etc., biologische oder chemische Substanzen, welche mit den Nachweisreagenzien eine Redoxreaktion eingehen können, z.B. Ascorbinsäure, Cystein, Glutathion, Thioredoxin etc., metabolisierbare Substanzen, z.B. Glucose, Milchsäure, Triglyceride, Cholesterin etc., immunologisch reaktive Substanzen, z.B. Antigene, Haptene und Antikörper, und Nukleinsäuren oder Nukleinsäurederivate wie peptidische Nukleinsäuren als Analyten nachgewiesen werden.

Demzufolge können die erfindungsgemäßen Verbindungen in zahlreichen Anwendungsgebieten als Nachweisreagenzien eingesetzt werden, z.B. in Flüssig- oder Trockentests für die klinische Diagnostik. Weiterhin können sie in der Histologie zum Nachweis und zur Lokalisierung reduzierender oder oxidierender Enzyme, in der Zellbiologie für Zellproliferations- und Cytotoxizitätstests, ferner für Keimfähigkeitsprüfungen von Saatgut, zur Vitalfärbung, zum histochemicalen und cytochemischen Nachweis von Dehydrogenasen in Gewebe, z.B. in Normal- oder Tumorgewebe, und als Nachweismittel in der Dünnschichtchromatographie, z.B. zum Nachweis von Corticosteroiden verwendet werden.

Die Verbindungen der allgemeinen Strukturformeln I und II können als direkte Nachweisreagenzien eingesetzt werden, d.h. die Bestimmung des Analyten erfolgt direkt über eine nachweisbare Änderung der Moleküleigenschaften der Verbindungen. Andererseits können die Verbindungen auch als Mediatoren wirken und gekoppelt mit einem weiteren 55 Nachweissystem eingesetzt werden, d.h. die Bestimmung des Analyten erfolgt nicht direkt über die Änderung der Moleküleigenschaften der Verbindungen, sondern über ein weiteres Nachweissystem, z.B. ein elektrochemisches Nachweissystem (vgl. z.B. EP-A-0 441 222) oder weitere chemische Verbindungen, z.B. Tetrazoliumverbindungen.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden die Verbindungen gemäß den Struktur-

formeln I und II zum Nachweis einer Oxidoreduktase-Aktivität verwendet, wobei der zu bestimmende Analyt einerseits die Oxidoreduktase selbst oder andererseits ein Oxidoreduktase-Substrat sein kann. Der Nachweis erfolgt vorzugsweise in Gegenwart eines Oxidoreduktase-Cosubstrats, insbesondere des Systems NAD(P)⁺ oder NAD(P)H/H⁺, oder aber auch anderer Cosubstrate wie etwa Flavinen oder PQQ.

5 Die Bestimmung der Oxidoreduktase-Aktivität kann in Gegenwart von Mediatoren erfolgen, welche die Übertragung von Elektronen vom Enzym-Cosubstrat auf die oxidierte Verbindung bzw. die umgekehrte Reaktion, d.h. die Übertragung von Elektronen von der reduzierten Verbindung auf das Enzym-Cosubstrat katalysieren. Beispiele geeigneter Mediatoren für NAD(P)-abhängige Dehydrogenasen sind das Enzym Diaphorase oder N-Methylphenaziniummethosulfat. Es ist jedoch auch eine direkte Übertragung von Elektronen von einem Enzym-Cosubstrat auf die oxidierte Verbin-

10 dung bzw. die direkte Übertragung von Elektronen von der reduzierten Verbindung auf ein Enzym-Cosubstrat möglich.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von Verbindungen der Strukturformeln I oder/und II zum Nachweis einer Dye(Farbstoff)-Oxidoreduktase-Aktivität, z.B. einer Glucose-Dye-Oxidoreduktase-Aktivität. Hierbei kann die Übertragung von Elektronen direkt von einem Enzymsubstrat auf die oxidierte Verbindung erfolgen. Vorzugsweise wird jedoch ein Coenzym Mediator, z.B. PQQ, verwendet. Zur Bestimmung

15 anderer Analyten kann der Nachweis einer oxidierenden Aktivität auch unter Verwendung der reduzierten Form der erfindungsgemäßen Verbindung erfolgen.

Noch eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung ist die Verwendung von Verbindungen der Strukturformeln I oder/und II zum Nachweis einer Hydrolase-Aktivität, wobei die Hydrolase oder auch ein Hydrolase-Substrat der zu bestimmende Analyt sein kann. Vorzugsweise erfolgt ein solcher Nachweis über ein oxidatives Kupplungssystem, z.B. über eine β-Galactosidasekupplung, wobei die Hydrolyse durch Spaltung eines Hydrolase-Substrats eine oxidierbare Verbindung bildet, bei deren Oxidation, die erfindungsgemäße oxidierte Verbindung reduziert wird.

Außerdem betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Bestimmung eines Analyten in einer Probe, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man die Probe mit einem Reagenz in Kontakt bringt, welches mindestens eine Verbindung der Strukturformeln I oder/und II enthält, und die Bestimmung des Analyten über eine Änderung von nachweisbaren Eigenschaften des Reagenz durchführt. Ein erfindungsgemäßes Reagenz zur Bestimmung eines Analyten enthält mindestens eine Verbindung der Strukturformeln I oder/und II und kann als Bestandteil eines Reagenzienkits vorliegen, der zusätzliche weitere Testkomponenten, z.B. Mediatoren, Begleitsubstanzen wie Puffer, Salze, Detergentien und gegebenenfalls weitere Hilfsreagenzien in Form von einem Reagenz oder von mehreren separaten Teilreagenzien enthält. Die Begleitsubstanzen können gegebenenfalls so ausgewählt werden, daß sie eine Modifizierung der Moleküleigenschaften, wie etwa der spektralen Charakteristika, der erfindungsgemäßen Verbindungen ermöglichen, z.B. durch pH-Änderung oder/und durch Zusatz von Detergentien.

Das erfindungsgemäße Reagenz kann ein Reagenz für einen Flüssigkeitstest sein, das z.B. in Form einer Lösung oder Suspension in einer wässrigen oder nicht wässrigen Flüssigkeit oder als Pulver oder Lyophilisat vorliegt. Andererseits kann das Reagenz auch als Trockentest-Reagenz z.B. in einem saugfähigen oder quellbaren Träger aufgezogen oder eingebaut in eine lichtempfindliche Filmschicht vorliegen. Ein Flüssigkeitstest-Reagenz enthält vorzugsweise sämtliche für das erfindungsgemäße Verfahren benötigten Komponenten. Als Lösungs- oder Suspendiermittel kommen bevorzugt Wasser, aber auch Mischungen mit wasserlöslichen organischen Lösungsmitteln, wie etwa Alkoholen, Aceton oder Dimethylformamid in Frage. Aus Haltbarkeitsgründen kann es vorteilhaft sein, die für den Test benötigten Komponenten auf zwei oder mehrere Teilreagenzien zu verteilen, die erst bei der eigentlichen Analyse vermischt werden.

40 Das erfindungsgemäße Reagenz kann auch in Form eines Teststreifens vorliegen. Solche Teststreifen sind in verschiedenen Ausführungsformen bekannt, vgl. z.B. DE-A-32 47 608, EP-A-0 262 445 oder EP-A-0 256 806. In einem Teststreifen liegen die zur Durchführung des Bestimmungsverfahrens benötigten Komponenten des Reagenz auf festen Trägerschichten vor. Als Trägerschichten kommen insbesondere saugfähige oder/und quellbare Materialien in Frage die von der zu untersuchenden Probeflüssigkeit benetzt werden. Beispiele sind Gelatine, Cellulose, organische Polymere und Copolymere oder Kunstfaservliese. In oder auf diesen Trägermaterialien liegen die Komponenten des Reagenz in fester Form vor. Bei Aufgabe der Probe auf den Teststreifen oder Eintauchen des Teststreifens in die Probe bildet sich in den Streifen ein flüssiges Milieu aus, innerhalb dem die Nachweisreaktion abläuft. Eine durch die Reaktion verursachte Farbänderung kann visuell oder photometrisch, z.B. reflektometrisch oder auch elektrochemisch ausgewertet werden.

50 Weiterhin können die erfindungsgemäßen Verbindungen auch in lichtempfindliche Film- bzw. Photoschichten eingebaut werden. In diesem Fall ist die Trägerschicht ein zumindest im wesentlichen transparentes Filmmaterial, das vorzugsweise für elektromagnetische Strahlung der Wellenlängen von 200 - 900 nm durchlässig ist. Geeignete Trägermaterialien sind organische Polymere und Copolymere, z.B. Polystyrole, Polyester, Polycarbonate, Celluloseester etc., bzw. Copolymere davon (vgl. z.B. WO86/04681, Beispiele 11-13).

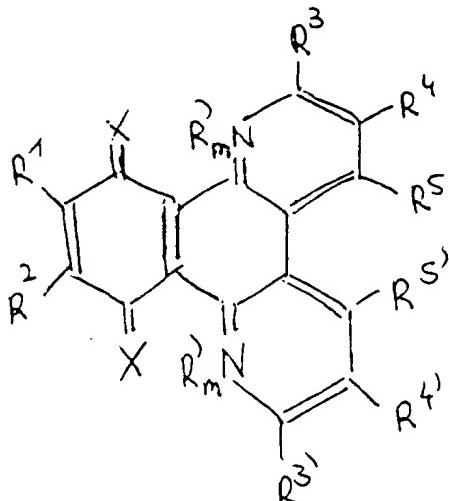
55 Die Konzentration der eingesetzten Verbindungen richtet sich nach der Konzentration des zu messenden Analyten. Typische Konzentrationen für die im erfindungsgemäßen Verfahren zu messenden Analyten sind 10^{-6} bis 10^{-1} mol/l im Fall von Substraten oder bis zu 10^{-15} mol/l beim Nachweis von Enzymaktivitäten. Entsprechend sind typische Konzentrationen der eingesetzten Verbindungen 10^{-6} bis 1 mol/l. Sofern weitere nachweisbare Verbindungen, z.B. Tetrazolium-

verbindungen oder bestimmte oxidative Kupplungsreagenzien, in Kombination mit den erfundungsgemäßen Verbindungen eingesetzt werden, sind sie vorzugsweise mindestens im stöchiometrischen Verhältnis zu den eingesetzten erfundungsgemäßen Verbindungen vorhanden, besonders bevorzugt in einem 1,5 bis 2-fachen Überschuß.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind neue Verbindungen der allgemeinen Strukturformeln I oder II, insbesondere solche Verbindungen, die mindestens eine hydrophile Gruppe wie vorstehend definiert enthalten, ausgenommen Indanthrenmonosulfonsäure, Indanthrendisulfonsäure sowie deren Natrium- und Kaliumsalze.

Besonders bevorzugt sind neue Verbindungen mit den allgemeinen Strukturformeln VIIa, VIIb, VIIIa oder VIIIb:

10



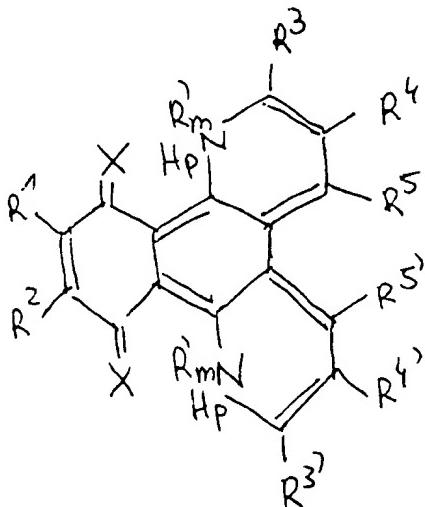
15

20

25

30

(VIIIa)



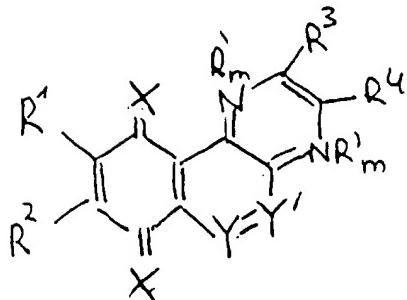
(VIIIb)

35

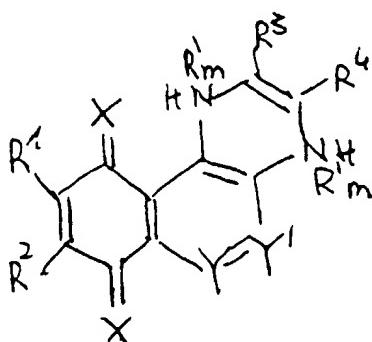
40

45

50



(VIIa)



(VIIb)

55

worin R¹, R², X, R¹, m, p, R³, R⁴, R⁵, R^{3'}, R^{4'}, R^{5'}, Y und Y' wie in den Verbindungen (I) definiert sind. Besonders bevorzugt bedeutet X gleich O. Weiterhin ist bevorzugt, daß mindestens einer der Reste R¹ und R² oder/und R³,

⁵ R⁴, R⁵, R³, R^{4'}, R^{5'} ein aromatisches oder heteroaromatisches Ringssystem umfaßt. R¹ und R² können beispielsweise einen gegebenenfalls substituierten Benzolring bilden und in den Verbindungen (VIIa) und (VIIb) können R³ und R⁴ miteinander verbrückt sein und beispielsweise ein gegebenenfalls substituiertes Naphthalin- oder Anthrachinonringssystem bilden. Entsprechend können in den Verbindungen (VIIla) und (VIIlb) (a) R³ und R⁴ oder/und R³ und R^{4'} oder (b) R⁴ und R⁵ oder/und R^{4'} und R^{5'} miteinander verbrückt sein und beispielsweise ein Ringsystem bilden, das eine aromatische oder heteroaromatische Struktur enthält.

Y und Y' bedeuten vorzugsweise jeweils CR⁶, wobei R⁶ die für die Verbindung (I) angegebene Bedeutung besitzt.

¹⁰ Die Erfindung soll durch die nachfolgenden Abbildungen und Beispiele näher erläutert werden.
Es zeigen:

- ¹⁵ Fig. 1 allgemeine Strukturformeln für bevorzugte erfindungsgemäße Indikatorsubstanzen,
- Fig. 2 Strukturformeln der in den Beispielen 1-4 hergestellten Benzonaphthophenazin-8,13-dione,
- ²⁰ Fig. 3 Strukturformeln weiterer erfindungsgemäßer Benzonaphthophenazin-8,13-dione,
- Fig. 4 Strukturformeln der in den Beispielen 5 und 6 hergestellten Dehydroanthrensulfonsäuren und des in Beispiel 7 hergestellten Pyridylnaphtho-chinoxalin-7,12-dionmethylsulfats,
- ²⁵ Fig. 5 UV/Vis-Spektren eines erfindungsgemäßen Indikators beim Nachweis von Glucose,
- Fig. 6 UV/Vis-Spektren eines erfindungsgemäßen Indikators beim Nachweis von NADH in Gegenwart des Mediators Diaphorase,
- ³⁰ Fig. 7 ein UV/Vis-Spektrum der Bestimmung von NADH mit einem erfindungsgemäßen Indikator in Gegenwart des Mediators Diaphorase,
- Fig. 8 ein UV/Vis-Spektrum der Kinetik der Reaktion eines erfindungsgemäßen Indikators mit NADH in Gegenwart des Mediators Phenazinmethosulfat,
- ³⁵ Fig. 9 ein UV/Vis-Spektrum eines erfindungsgemäßen Indikators bei einer Bestimmung der β-Galactosidase-Aktivität und
- Fig. 10 einen Vergleich der Lichtstabilität zwischen einem Tetrazoliumsalz und einem erfindungsgemäßen Indikator.

BEISPIELE

Beispiele 1 - 4:

Herstellung von Benzonaphthophenazin-8,13-dionen

⁴⁵ Die Herstellung der Verbindungen gemäß den Beispielen 1-4 erfolgt durch Kondensation von Diaminoanthrachinonen mit Ortho-Dicarbonylverbindungen.

Beispiel 1: 8,13-Dihydro-benzo[a]naphtho[2,3-h]phenazin-8,13-dion-3,6-disulfonsäure-Dinatriumsalz und 10,15-Dihydro-benzo[a]naphtho[2,3-j]phenazin-10,15-dion-3,6-disulfonsäure-Dinatriumsalz

⁵⁰ Eine Suspension von 4.8 g (0.02 mol) 1,2-Diaminoanthrachinon und 7.2 g (0.02 mol) 1,2-Naphthochinon-3,6-disulfonsäure-dinatriumsalz (hergestellt nach W. Langenbeck, H. Le Blanc, B. Lukowcyk. Chem. Ber. 1954, 87, 496; C. Grundmann in Methoden der Organischen Chemie (Houben Weyl) Hrsg. C. Grundmann Georg Thieme Verlag Stuttgart 1979, Band VII 3b (Chinone II) S. 64 - 75) in 100 ml Essigsäure wird 2 h unter Rühren unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird mit 1000 ml Wasser versetzt. Die Mischung wird filtriert und anschließend das Filtrat dreimal mit Essigester ausgeschüttelt. Die abgetrennte wässrige Phase wird auf 50 ml eingengeht. Nach Säulenchromatographie an LH 20 mit Wasser als Eluenten erhält man je 1 g der beiden Isomeren.

(Daten für ein Isomeres):

neg. LSIMS (Wasser/Gly/m-NBA): m/z 542 [m-Na+H], 519 [m-2Na+H], 520 [m-2Na+2H]
 5 UV/Vis-Absorption (0.1 M Phosphatpuffer pH = 7.0): 420 nm; nach Reduktion mit Ascorbinsäure: 780 , 703, 570
 nm
 1H-NMR (d6-DMSO) ppm: 7.92 (t, [1 H]), 7.99 (t [1 H]), 8.18 (d, [1 H]), 8.20 (d, [1 H]), 8.32 (d, [1 H]), 8.35 (s, [1 H]),
 8.58 (d, [1 H]), 8.76 (s, [1 H]), 8.78 (d, 1 H), 9.35 (d,[1H]), 13C-NMR (d6-DMSO) ppm: 125.53, 125.75, 126.06,
 126.65, 126.69, 128.64, 130.98, 131.31, 131.58, 133.65, 133.75, 134.75, 135.51, 136.08, 137.98, 140.68, 141.55,
 143.11, 143.44, 150.63, 182.35, 183.02

10

(Daten für anderes Isomeres):

neg. LSIMS (Wasser/Gly/m-NBA): 520, [m-2Na+2H],
 1H-NMR (d6-DMSO) ppm: 7.95 (t, [1 H]), 7.08 (t, [1 H]), 8.17 (d, [1H]), 8.19 (d, [1 H]), 8.32 (s, [1 H]), 8.36 (d [1 H]),
 15 8.68 (d [1 H]), 8.73 (s, [1 H]), 8.73 (d, [1 H]), 9.40 (d,[1H])
 UV/Vis-Absorption (0.1 M Phosphatpuffer pH = 7.0): 414 nm; nach Reduktion mit Ascorbinsäure: 805, 660, 555 nm

Die Strukturformeln der beiden Isomere sind in Fig. 2a und 2b dargestellt.

20

Beispiel 2: 15-Brom-8,13-dihydro-benzo[a]naphtho[2,3-h]phenazin-8,13-dion-3,6,11-trisulfonsäure-trinatrium-salz und 8-Brom-10,15-dihydro-benzo[a]naphtho[2,3-j]phenazin-10,15-dion-3,6,12-trisulfonsäure-trinatrium-salz

25

Zu einer Lösung von 1 g (3 mmol) 2-Amino-anthrachinon-6-sulfonsäure (O. Bayer in Methoden der Organischen Chemie (Houben Weyl) Hrsg. O. Bayer Georg Thieme Verlag Stuttgart 1979, Band VII 3c (Chinone III) S. 182) in 5 ml 75% Schwefelsäure werden 0.6 ml (15 mmol) Brom gegeben. Es wird 3 h auf 105 °C erwärmt und nach Abkühlen auf Raumtemperatur mit 50 ml Wasser versetzt. 1.5 g des Rohprodukts (1,3-Dibrom-2-amino-anthrachinon-6-sulfonsäure) werden ohne Aufreinigung mit 15 ml einer 25 % Ammoniaklösung im Autoklaven bei 100 °C umgesetzt. Das Produkt (1,2-Diamino-3-brom-anthrachinon-6-sulfonsäure) wird durch Zugabe gesättigter Natriumchloridlösung gefällt und durch Säulenchromatographie an LH 20 mit Methanol/Wasser 1 : 1 als Eluenten gereinigt (violette "Bande" wird gesammelt).

30

Eine Suspension von 400 mg (1 mmol) 1,2-Diamino-3-brom-anthrachinon-6-sulfonsäure und 550 mg (1 mmol) 1,2-Naphthochinon-3,6-disulfonsäure-dinatriumsalz (siehe oben) in 6 ml Essigsäure wird 2 h unter Rühren unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Die Aufarbeitung des Reaktionsgemisches erfolgt analog Bsp. 1. Es werden je 100 mg der beiden Isomeren erhalten.

35

Daten für ein Isomeres:

neg. LSIMS (Wasser/Gly/m-NBA): m/z 677 [m-3Na+H], 678 [m-3Na+2H]
 40 UV/Vis-Absorption (0.1 M Phosphatpuffer pH = 7.0): 422 nm; nach Reduktion mit Ascorbinsäure: 802 , 716, 660
 nm

Daten für anderes Isomeres:

45

UV/Vis-Absorption (0.1 M Phosphatpuffer pH = 7.0): 416 nm nach Reduktion mit Ascorbinsäure: 810 (schwach),
 715 (schwach), 545 nm

Die Strukturformeln der beiden Isomere sind in Fig. 2c und d dargestellt.

50

Beispiel 3: 8,13-Dihydro-3-nitro-benzo[a]naphtho[2,3-h]phenazin-8,13-dion-6-sulfonsäure oder 10,15-Dihydro-3-nitro-benzo[a]naphtho[2,3-j]phenazin-10,15-dion-3,6-sulfonsäure

55

6 mmol 5-Amino-6-hydroxy-naphthalin-2 sulfonsäure (H. E. Fierz-David, L. Blangely, H. Kaul, Helv. Chim. Acta 1946, 29, 1765) werden in 10 ml 68 % Salpetersäure 30 min auf 80 °C erwärmt. Nach schnellem Abkühlen auf 0 °C werden 50 ml gesättigte Natriumchloridlösung zugegeben. Der braungrüne Niederschlag wird abgesaugt und an der Luft getrocknet. Die rohe 3-Nitronaphtho-1,2-chinon-6 sulfonsäure wird mit 3 mmol Diaminoanthrachinon in 20 ml Eisessig 2 h unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Die Aufarbeitung erfolgt wie unter Beispiel 1 beschrieben. Ausbeute: 40 mg (nur ein Isomeres isoliert).

neg. LSIMS (Wasser/Gly/m-NBA): m/z 484 [m-Na]
 UV/Vis-Absorption (0.1 M Phosphatpuffer pH = 7.0): 410 nm; nach Reduktion mit Ascorbinsäure: 800 (schwach),
 638 nm

5 Die Strukturformel der Verbindungen ist in Fig. 2e dargestellt.

Beispiel 4: 8,13-Dihydro-4-bis(2-hydroxyethyl)amino-benzo[a]naphtho[2,3-h]phenazin-8,13-dion und 10,15-Dihydro-4-bis(2-hydroxyethyl)amino-benzo[a]naphtho[2,3-j]phenazin-10,15-dion

10 238 mg (1 mol) Diaminoanthrachinon und 261 mg (1 mol) 4-Bis(2-hydroxyethyl)amino-1,2-naphthochinon (hergestellt aus 1,2-Naphthochinon-4-sulfonsäure-Natrium-salz und Diethanolamin nach der Vorschrift in: C. Grundmann in Methoden der Organischen Chemie (Houben Weyl) Hrsg. C. Grundmann Georg Thieme Verlag Stuttgart 1979, Band VII 3b (Chinone II) S. 64 - 75) werden in 20 ml Eisessig 2 h unter Rühren unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Essigsäure im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wird mit Essigester/Methanol/Eisessigmischung (2 : 2 : 1) als Eluent an Kieselgel getrennt. Die zitronengelbe Bande wird gesammelt. Ausbeute: 20 mg (Isomerengemisch) UV/Vis-Absorption (H_2O): 445 nm; nach Reduktion: 548 nm

Die Strukturformeln der beiden Isomere sind in Fig. 2f und 2g dargestellt.

15 Weitere Verbindungen, die nach den oben beschriebenen Verfahren durch Kondensation von literaturbekannten oder unter Bsp. 1- 4 beschriebenen Diaminoanthrachinonen mit literaturbekannten bzw. kommerziell erhältlichen 1,2-Dicarbonylverbindungen bzw. deren Hydraten erhalten wurden, sind in Fig. 3 zusammengefaßt.

Beispiele 5-6:

Herstellung von Dehydroindanthrensulfonsäuren

20 Dehydroindanthrensulfonsäuren erhält man durch Sulfonierung von Indanthrenen und anschließende Oxidation. Die Verfahren zur Herstellung sind im Lehrbuch Friedländer beschrieben.

Beispiel 5: Dehydroindanthronmonosulfonsäure (nach Lit.: Fr. IX, 783)

25 Es werden 0.5 g (8 mmol) Borsäure in 10 ml konz. Schwefelsäure heiß gelöst. Zu der heißen Lösung werden 0.3 g (0.7 mmol) Indanthron zugegeben und die Mischung vier Stunden unter Rückfluß gekocht. Der Ansatz wird abgekühlt und mit 50 ml dest. Eiswasser verdünnt. Anschließend wird filtriert, dabei wird der größte Teil der Schwefelsäure entfernt. Der Rückstand wird in wenig dest. Wasser aufgekocht, heiß filtriert, ausgewaschen und getrocknet. (Ausbeute: 0.25 g Indanthron-Monosulfonsäure) Er wird dann mit einer Mischung aus 10 ml konz. Schwefelsäure und 10 ml rau-chender Salpetersäure eine Viertelstunde unter Eiskühlung gerührt. Anschließend wird unter Eiskühlung mit Wasser auf 50 ml verdünnt und abgesaugt. Der braune Feststoff wird an Sephadex LH-20 mit Methanol als Eluent gereinigt. Die Fraktionen, die sich bei Zugabe von Ascorbinsäure blau färben, werden vereinigt. Das Lösungsmittel wird abdestilliert und der Rückstand in Wasser aufgenommen. Die Lösung wird lyophilisiert. Ausbeute: 90 mg

30 UV/Vis-Absorption: (0.1 M Phosphatpuffer pH = 7.0): 392 nm; nach Reduktion 717, 667 nm.

Die Strukturformel der Verbindung ist in Fig. 4 oben (n=1) dargestellt.

35 **Beispiel 6: Darstellung von Dehydroindanthrondisulfonsäure-Dinatriumsalz (nach Lit.: Fr. VI, 413)**

40 2 g Indanthron werden mit 1 g Borsäure und 60 ml rauchender Schwefelsäure (Oleum, 30 % SO₃) so lange zum Sieden erhitzt, bis eine Probe der Reaktionslösung mit viel Wasser verdünnt eine klare blaue Lösung ergibt. Anschließend wird die ölige Lösung vorsichtig in 200 ml Eiswasser eingetropft. Die Mischung wird über eine D 4-Glasfritte abge-saugt. Man erhält einen Filterkuchen, der noch Wasser und Schwefelsäure enthält. Die noch feuchte Indanthrondisulfonsäure aus obiger Reaktion wird mit 20 ml rauchender Salpetersäure eine Viertelstunde unter Eisküh-lung gerührt. Anschließend wird mit unter Kühlung langsam mit 50 % Natronlauge neutralisiert. Die Lösung wird über Diaion mit Wasser als Eluenten entsalzt. Das braune Eluat wird eingeengt und analog Beispiel 5 an Sephadex LH-20 mit Wasser als Eluent getrennt. Ausbeute: 200 mg

45 UV/Vis-Absorption: in 0.1 M Phosphatpuffer pH = 7.0): 394 nm; nach Reduktion 790, 714, 655 (sh).

50 Die Strukturformel der Verbindungen ist in Fig. 4 oben (n=2) dargestellt. Die Substitutionspositionen der Sulfonsä-

rreste sind vermutlich die Positionen 7 und 16.

Beispiel 7: 2-(Pyrid-2-yl)-3-(1-Methylpyrid-2-ylum)naphtho[2,3-a]chinoxalin-7,12-dionmethylsulfat

5 2,38 g (10 mmol) 1,2-Diaminoanthrachinon und 2,12 g (10 mmol) Bipyridyl werden in 10 ml Eisessig 5 min unter Rühren unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird abgesaugt. Der Rückstand wird aus Eisessig umkristallisiert. (Ausbeute: 2,45 g, 2,3-(Dipyrid-2-yl)-naphtho [2,3-a]chinoxalin-7,12-dione). Dieser Rückstand (5,84 mmol) wird zusammen mit 0,6 ml (6,42 mmol) Dimethylsulfat in 10 ml Nitrobenzol 30 min auf 100°C erwärmt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird durch Zugabe von 50 ml Ether gefällt. Der Rückstand wird abgesaugt und viermal aus Acetonitril mit Ether umgefällt. Er wird in 200 ml siedendem Isopropanol aufgenommen und filtriert. Das Filtrat wird mit Ether/Petrolether 1:1 versetzt. Es fallen feine blaßorange Nadelchen aus. Ausbeute: 250 mg.

10 Die Strukturformel der Verbindung ist in Figur 4 unten dargestellt.

15 LSIMS: m/z 429

UV (0,1 M Phosphatpuffer pH=7,0): 380 nm nach Reduktion mit Ascorbinsäure: 533 nm;
 1 H-NMR (CD_3CN) ppm: 3,51 (s, [3H]), 4,25 (s,[3H]), 7,46 (m, [1 H]), 7,90 (m[3 H]), 8,15 (dd,[2 H]), 8,24 [d, [1 H],
 8,29 (dd, [2 H]), 8,55 (dd,[2 H]), 8,74 (d, [1 H]), 8,83 (d, [1 H]), 8,94 (d, 1H)
 13C-NMR (CD_3CN) ppm: 47,46, 53,65, 124,97, 126,52, 127,27, 127,62, 128,13, 128,65, 128,96, 129,99, 132,88,
 134,90, 135,84, 136,11, 138,42, 139,08, 140,70, 143,39, 146,19, 146,67, 147,05, 149,80, 152,02, 153,77, 154,81,
 157,83, 183,45, 183,85.

Beispiel 8: Reaktion eines Indikators mit Glucose/GlucDOR

25 In einer Küvette werden gemischt:

20 µl einer 5 mM Lösung des Indikators (Dehydroanthrondisulfonsäure-Dinatriumsalz) in dest. Wasser:
 1870 µl 0,1 M Phosphatpuffer pH = 7
 10 µl 1 M Glucose-Lösung

30 Es werden 100 µl einer GlucDOR Lösung (in 0.05 M Hepes Puffer pH 7.0 mit PQQ c = 0.016 mg/ml und Calcium-chlorid c = 0.7 mol/l) mit der Konzentration 300 U/ml zugegeben. Alle 60 sec. nach Zugabe wird ein UV/Vis Spektrum aufgenommen (Fig. 5). Nach 8 min ist keine Farbänderung mehr zu messen.

Beispiel 9: Reaktion eines Indikators mit NADH/Diaphorase

35 In einer Küvette werden gemischt:

20 µl einer 5 mM Lösung des 8,13-Dihydro-benzo[a]naphtho[2,3-h]phenazin-8,13-dion-3,6-disulfonsäure-Dinatriumsalzes oder des [2,3-j]-Isomeren in dest. Wasser
 40 1870 µl 0,1 M Phosphatpuffer pH = 7
 10 µl einer 0,1 M NADH Lösung in dest. Wasser

Es werden 100 µl einer Diaphorase-Lösung gelöst in 0,1 M Phosphatpuffer pH = 7 mit der Konz. 100 U/ml zugegeben und nach 60 sec ein UV/Vis Spektrum aufgenommen (Fig. 6).

45 **Beispiel 10: Bestimmung von NADH**

Meßansatz: (Endkonzentrationen)

50 Phosphatpuffer pH = 7 100 mM
 Indikator: 0,5 mM

(8,13-Dihydro-benzo[a]naphtho[2,3-h]phenazin-8,13-dion-3,6-disulfonsäure-Dinatriumsalz) oder das [2,3-j]-Isomere

55 NADH: 50 -100 µmol

Mit einer Diaphorase Lösung (100 U/ml, 0,1 M Phosphatpuffer pH = 7) wird eine Endkonzentration in der Küvette von 5 U/ml eingestellt und nach einer Minute die Extinktionsänderung bei 704 nm ermittelt. Mit zunehmender NADH-

Konzentration wird eine zunehmende Menge eines blaugrünen Farbstoffs gebildet (Fig. 7).

Beispiel 11: Kinetik der Reaktion eines Indikators mit Phenazinmethosulfat/NADH

5 In einer Küvette werden nacheinander gemischt:

20 µl einer 5 mM Lösung des 8,13-Dihydro-benzo[a]naphtho[2,3-h]phenazin-8,13-dion-3,6-disulfonsäure-Dinatriumsalzes in dest. Wasser

1870 µl 0.1 M Phosphatpuffer pH = 7

10 10 µl einer 0.1 M NADH Lösung in dest. Wasser

100 µl einer Phenazinmethosulfat-Lösung gelöst in dest. Wasser mit der Konzentration 10 µg/ml.

Die Extinktion bei 703 nm wird in Abhängigkeit von der Zeit gemessen (siehe Fig. 8). Nach Zugabe des Mediators wird der blaue Farbstoff gebildet.

15 **Beispiel 12: Kombination mit einem Hydrolasesubstrat**

In einer Küvette werden vorgelegt:

20 20 µl einer 5 mM Lösung von 3-Indolyl-β-D-galactopyranosid
1860 µl 0.1 M Phosphatpuffer pH = 7

Es wird ein UV/Vis Spektrum aufgenommen.

Dann werden 100 µl einer β-Galactosidase Lösung in 0.1 M Phosphatpuffer pH=7 (384 U/ml) zugegeben. 150 sec. 25 nach der Zugabe wird ein UV/Vis Spektrum aufgenommen. Die Absorptionsbande des durch Luftsauerstoff gebildeten Indigos ist schwach zu sehen.

Dann werden 20 µl einer 5 mM Lösung des 8,13-Dihydro-benzo[a]naphtho[2,3-h]phenazin-8,13-dion-3,6-disulfonsäure-Dinatriumsalzes oder des [2,3-j]-Isomeren in dest. Wasser zugegeben.

Nach 150 sec wird ein UV/Vis Spektrum aufgenommen. Es bildet sich eine tiefblaue Lösung. Die Absorptionsbanden 30 beider Farbstoffe sind zu erkennen (siehe Fig. 9).

Beispiel 13: Lichtstabilität von kommerziellem NBT (4-Nitro blue tetrazolium chloride Boehringer Mannheim GmbH 1 087 479 Ch 14528121) und des 8,13-Dihydro-benzo[a]naphtho[2,3-h]phenazin-8,13-dion-3,6-disulfonsäure-Dinatriumsalz oder des [2,3-j]-Isomeren in Standardpuffer des Boehringer Mannheim Testkits (Best Nr. 35 1101 668) zur Fructosaminbestimmung mit NBT (J. D. Kruse-Jarres, J. Jarausch et al. Laboratoriumsmedizin 1989, 13, 245)

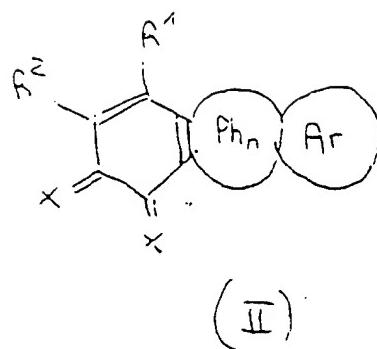
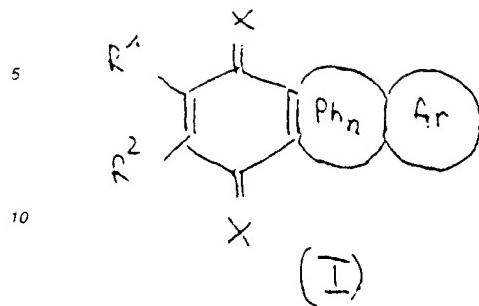
Jeweils 0.5 mM Lösungen von NBT bzw. des Benzonaphthophenazindions in einem 0.2 M Natriumcarbonatpuffer 40 pH = 10.3 mit 2.2 % Tensiden werden frisch hergestellt. Es wird ein UV/Vis Spektrum aufgenommen. Nach 10 min Stehenlassen im Dunkeln bei Raumtemperatur wird ein weiteres Spektrum aufgenommen. Die Spektren verändern sich nicht. Anschließend wird mit einer 60 W Krypton Lampe bestrahlt: Abstand zur Strahlungsquelle 30 cm, Raumtemperatur. Es werden Spektren nach 5, 10, 30, 60 min Gesamtbestrahlungszeit aufgenommen. Im Falle der NBT Lösung verändert sich das UV/Vis Spektrum mit zunehmender Bestrahlungszeit. Mit dem Auge ist eine Violettfärbung beobachtbar. Die Benzonaphthophenazindionlösung verändert sich hingegen nicht (siehe Fig. 10).

45 **Patentansprüche**

1. Verwendung von Verbindungen der Strukturformeln I oder/und II oder Salzen davon zur Herstellung von Nachweisreagenzien für ein Verfahren zur Bestimmung eines Analyten:

50

55



20 worin R^1 und R^2 jeweils unabhängig voneinander Wasserstoff, Halogene oder organische Reste sind,
 X O, S, $C(Acc)_2$, $CH(Acc)$ oder $N(Acc)$ bedeutet und Acc eine elektronenziehende Gruppe ist,
 Ph einen gegebenenfalls substituierten Phenylring bedeutet,
 n eine ganze Zahl von 0 bis 4 ist und
 Ar eine Gruppe der Strukturformeln IIIa, IIIb, IVa, IVb, Va, Vb, VIa oder VIb bedeutet:

25

30

35

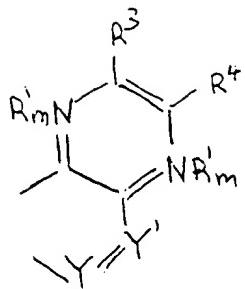
40

45

50

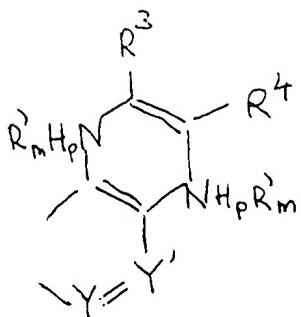
55

5



10

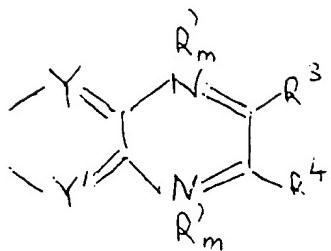
(IIIa)



15

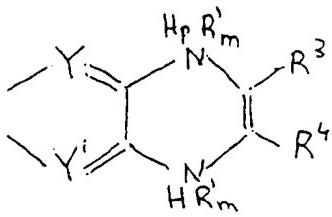
(IIIb)

20



25

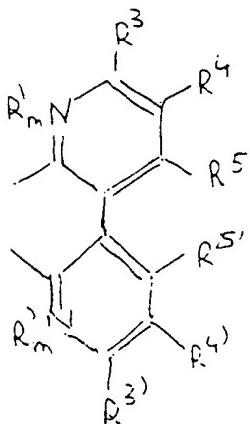
(IVa)



30

(IVb)

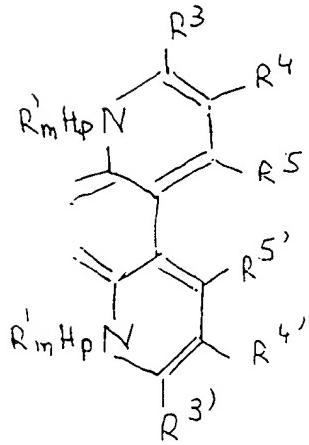
35



40

45

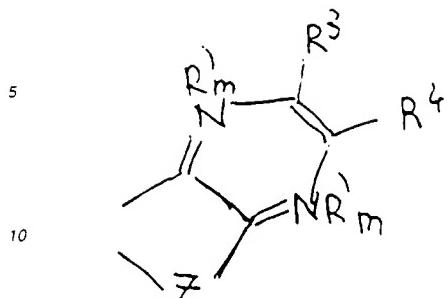
(Va)



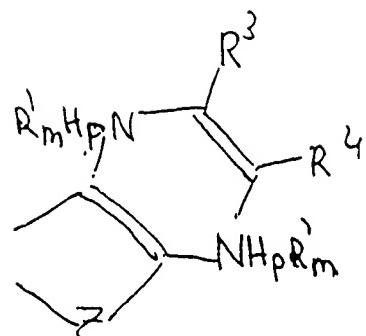
50

(Vb)

55



(VIa)



(VIb)

20 worin R³, R^{3'}, R⁴, R^{4'}, R⁵ und R⁷ jeweils unabhängig voneinander Wasserstoff, Halogen und organische Reste sind.

Y und Y' jeweils unabhängig voneinander N oder CR⁶ sind, wobei R⁶ Wasserstoff, Halogen oder ein organischer Rest ist,

25 Z NR, O oder S ist, wobei R ein organischer Rest oder Wasserstoff ist,
 R' jeweils unabhängig ein gegebenenfalls substituierter Alkyl- oder Arylrest ist und
 m jeweils unabhängig 0 oder 1 ist, wobei, wenn m gleich 1 ist, in den Strukturformeln (IIIa), (IVa), (Va) und
 (VIa) ein an R' gebundener Stickstoff eine positive Ladung trägt und ein entsprechendes Gegenion vor-
 30 handen ist, und in den Strukturformeln (IIIb), (IVb), (Vb) und (VIb) p gleich 0 ist und wobei, wenn m gleich
 0 ist, p gleich 1 ist.

2. Verwendung nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
 daß die Bestimmung des Analyten eine Redoxreaktion umfaßt, wobei eine nachweisbare Änderung der Moleküleigenschaften der Nachweisreagenzien erfolgt.
3. Verwendung nach einem der vorgehenden Ansprüche zur Bestimmung einer Oxidoreduktase-Aktivität.
- 40 4. Verwendung nach Anspruch 3,
dadurch gekennzeichnet,
 daß die Bestimmung in Gegenwart eines Oxidoreduktase-Cosubstrats, insbesondere PQQ, NAD(P)⁺ oder NAD(P)H/H⁺, erfolgt.
- 45 5. Verwendung nach einem der Ansprüche 3 bis 4,
dadurch gekennzeichnet,
 daß die Oxidoreduktase der zu bestimmende Analyt ist.
6. Verwendung nach einem der Ansprüche 3 bis 4,
dadurch gekennzeichnet,
 daß ein Oxidoreduktase-Substrat der zu bestimmende Analyt ist.
- 50 7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 2 zur Bestimmung einer Hydrolase-Aktivität.
- 55 8. Verwendung nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
 daß der Nachweis über ein oxidatives Kupplungssystem erfolgt.

9. Verwendung nach einem der Ansprüche 7 bis 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Hydrolase der zu bestimmende Analyt ist.
10. Verwendung nach einem der Ansprüche 7 bis 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß ein Hydrolase-Substrat der zu bestimmende Analyt ist.
11. Verwendung nach einem der vorgehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß in den Verbindungen der Strukturformeln I und II zumindest einer der Reste R¹ und R² ein aromatisches oder heteroaromatisches Ringsystem umfaßt, das gegebenenfalls substituiert sein kann.
12. Verwendung nach Anspruch 11,
dadurch gekennzeichnet,
daß R¹ und R² zusammen ein aromatisches oder heteroaromatisches Ringsystem bilden.
13. Verwendung nach einem der vorgehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß in den Gruppen der Strukturformeln IIIa, IIIb, IVa, IVb, Va, Vb, VIa und VIb zumindest einer der Reste R³, R⁴ und - sofern vorhanden - R^{3'}, R^{4'}, R⁵ und R^{5'} ein aromatisches oder heteroaromatisches Ringsystem umfaßt, das gegebenenfalls substituiert sein kann.
14. Verwendung nach Anspruch 13,
dadurch gekennzeichnet,
daß in den Gruppen der Strukturformeln IIIa, IIIb, IVa, IVb, VIa und VIb R³ und R⁴ miteinander verbrückt sind und vorzugsweise zusammen ein Ringsystem bilden, das zumindest teilweise eine aromatische oder heteroaromatische Struktur aufweist.
15. Verwendung nach Anspruch 13,
dadurch gekennzeichnet,
daß in den Gruppen der Strukturformeln Va und Vb (a) R³ und R⁴ oder/und R^{3'} und R^{4'} oder (b) R⁴ und R⁵ oder/und R^{4'} und R^{5'} jeweils miteinander verbrückt sind und vorzugsweise zusammen ein aromatisches oder heteroaromatisches Ringsystem bilden, das zumindest teilweise eine aromatische oder heteroaromatische Struktur aufweist.
16. Verwendung nach Anspruch 14 oder 15,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Reste jeweils zusammen ein gegebenenfalls substituiertes Naphthalin- oder Anthrachinonringsystem bilden.
17. Verwendung nach einem der vorgehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Verbindungen der Strukturformeln (I) oder/und (II) in Form von Metallkomplexen einsetzt.
18. Verfahren zur Bestimmung eines Analyten in einer Probe,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Probe mit einem Reagenz in Kontakt bringt, welches eine Verbindung der Strukturformeln (I) oder/und (II) enthält, und die Bestimmung des Analyten über eine Änderung von nachweisbaren Eigenschaften des Reagenz durchführt.
19. Reagenz zur Bestimmung eines Analyten in einer Probe,
dadurch gekennzeichnet,
daß es mindestens eine Verbindung der Strukturformeln (I) oder/und (II) enthält.
20. Reagenzienkit,
dadurch gekennzeichnet,
daß er neben anderen Testkomponenten ein Reagenz nach Anspruch 19 enthält.

21. Reagenzienkit nach Anspruch 20,

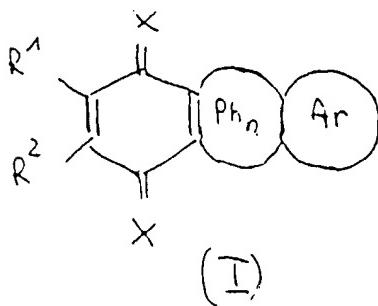
dadurch gekennzeichnet,

daß er Begleitsubstanzen enthält, die eine Modifizierung der Moleküleigenschaften von Verbindungen der Strukturformel (I) oder/und (II) bewirken.

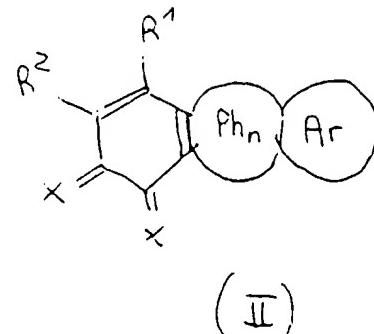
5

22. Verbindungen der allgemeinen Strukturformeln (I) oder (II):

10



15



20

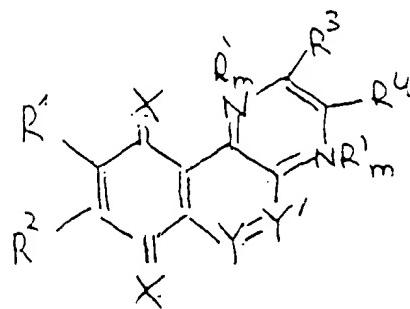
25

worin R¹, R², X, Ph, n und Ar wie in Anspruch 1 definiert sind und worin die Verbindungen mindestens eine hydrophile Gruppe enthalten, ausgenommen Indanthrenmonosulfonsäure, Indanthrendisulfonsäure sowie deren Natrium- und Kaliumsalze.

23. Verbindungen nach Anspruch 22 mit den allgemeinen Strukturformeln (VIIa) oder (VIIb):

30

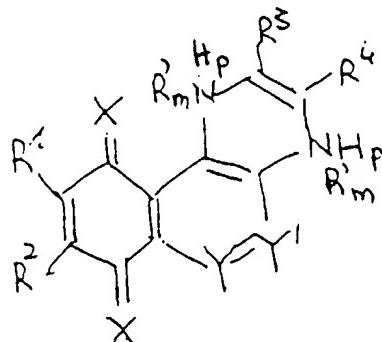
35



40

45

(VIIa)



(VIIb)

50

worin R¹, R², X, R', m, p, R³, R⁴, Y und Y' wie in Anspruch 1 definiert sind.

55

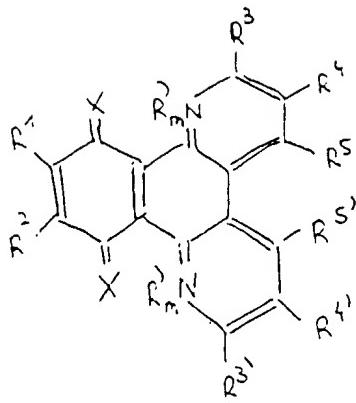
24. Verbindungen nach Anspruch 23 mit den allgemeinen Strukturformeln (VIIIa) oder (VIIIb):

5

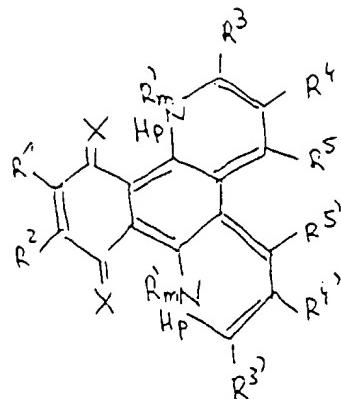
10

15

20



(VIII a)



(VIII b)

worin R¹, R², X, R', m, p, R³, R⁴, R⁵, R^{3'}, R^{4'} und R^{5'} wie in Anspruch 1 definiert sind.

25

25. Verbindungen nach einem der Ansprüche 22 - 24,
dadurch gekennzeichnet,
daß X gleich O bedeutet.

30 26. Verbindungen nach einem der Ansprüche 22 - 25,
dadurch gekennzeichnet,
daß mindestens einer der Reste R¹ und R² ein aromatisches oder heteroaromatisches Ringsystem umfaßt.

35 27. Verbindungen nach einem der Ansprüche 23 und 25 - 26,
dadurch gekennzeichnet,
daß mindestens einer der Reste R³ und R⁴ ein aromatisches oder heteroaromatisches Ringsystem umfaßt.

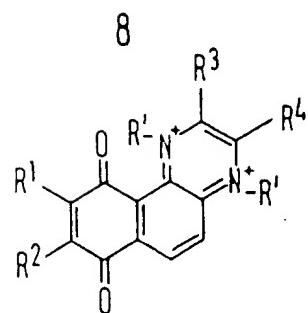
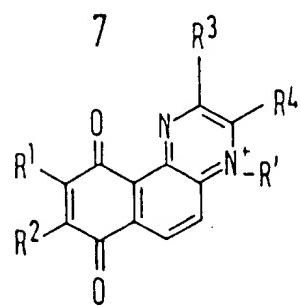
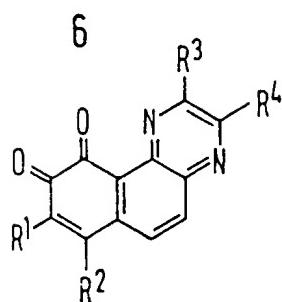
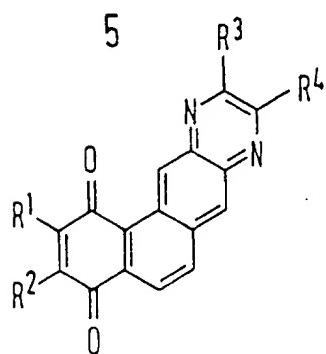
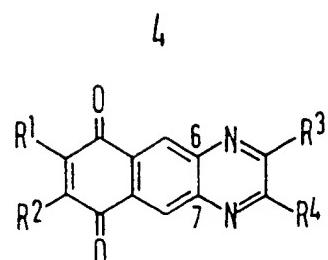
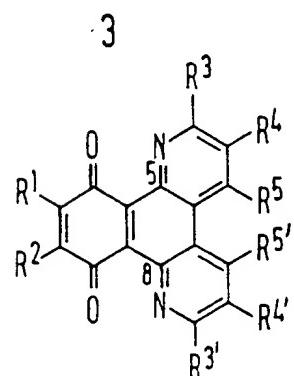
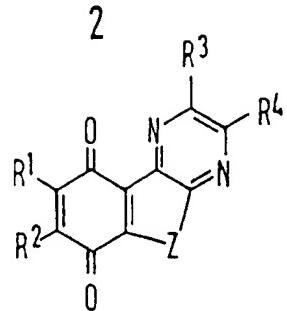
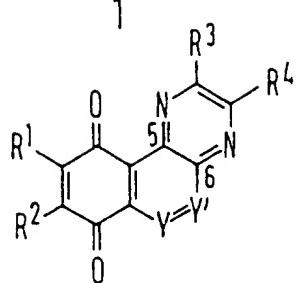
40 28. Verbindungen nach einem der Ansprüche 23 und 25 - 27,
dadurch gekennzeichnet,
daß Y und Y' jeweils CR⁶ bedeuten, wobei R⁶ die in Anspruch 1 angegebene Bedeutung besitzt.

45 29. Verbindungen nach einem der Ansprüche 24 - 28,
dadurch gekennzeichnet,
daß mindestens einer der Reste R³, R⁴, R⁵, R^{3'}, R^{4'}, R^{5'} ein aromatisches oder heteroaromatisches Ringsystem umfaßt.

50

55

FIG. 1



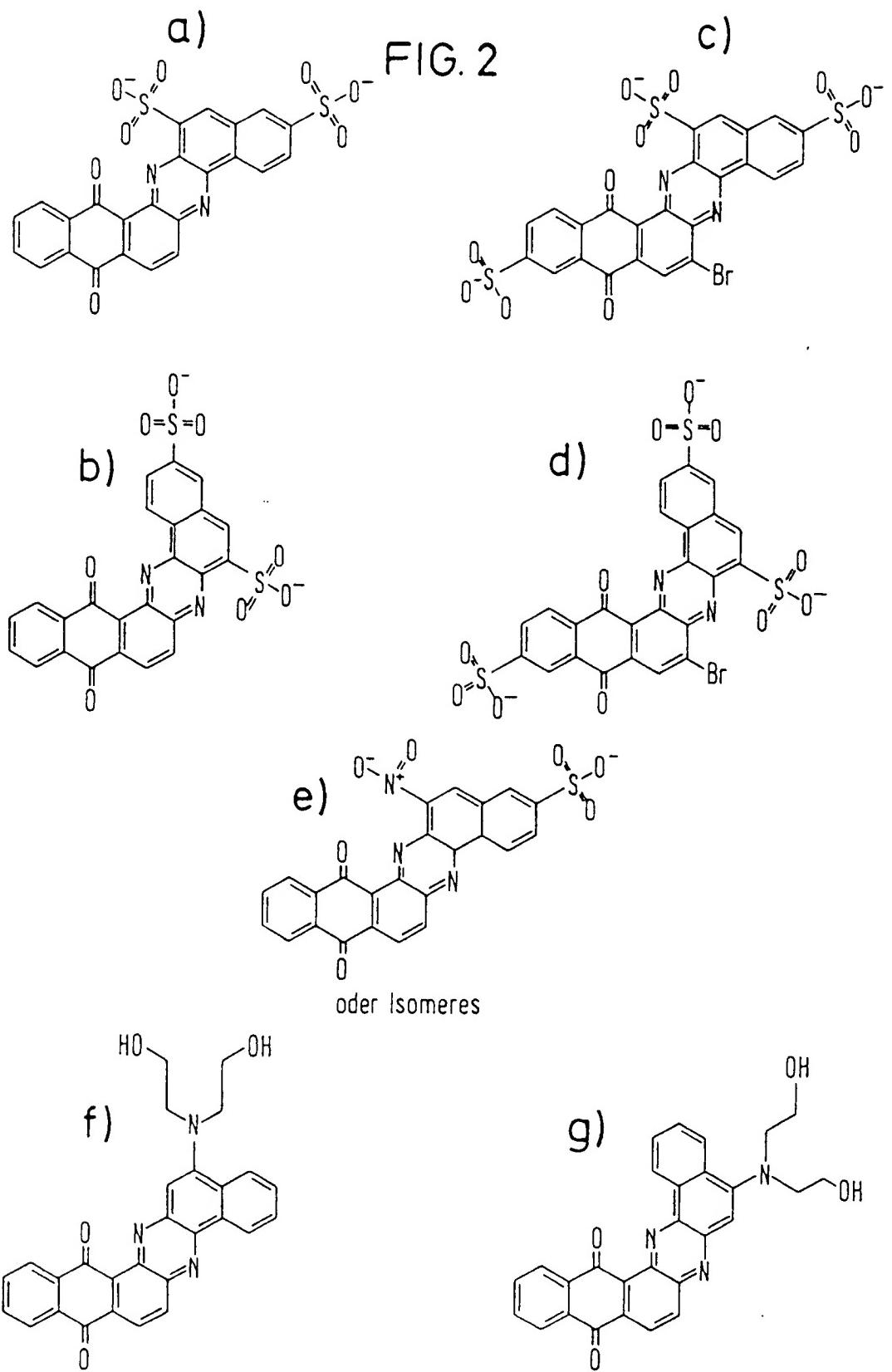
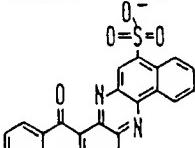
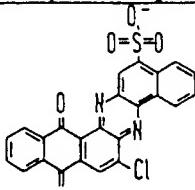
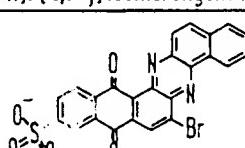
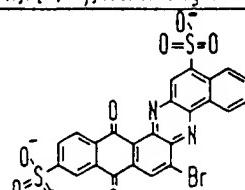
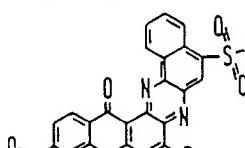
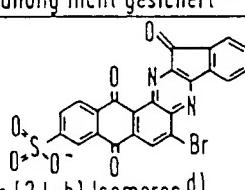


FIG. 3

Indikator	UV/VIS oxidierte Form [nm] 0,1m Phosphatpuffer pH=7	UV/Vis reduzierte Form [nm] 0,1m Phosphatpuffer pH=7
 [2,3-h]/[2,3-j] Isomerengemisch a)	431	559
 [2,3-h]/[2,3-j] Isomerengemisch a,b)	417 nm	650 689 785 (schwach)
 [2,3-h]/[2,3-j] Isomerengemisch a)	434	485 755 (schwach) 850 (s. schwach)
  Zuordnung nicht gesichert c)	430	554 745 (schwach) 830 (s. schwach)
 oder [2,1-b] Isomeres d)	425	529 730 (schwach) 830 (s. schwach)
	450 (schulter)	510 600 (schwach)

a) Die Isomeren wurden nicht getrennt. In der Tab. ist nur die Formel für das [2,3h] Isomere angegeben.

b) 1,2-Diamino-3-chloranthrachinon hergestellt nach: Gorelik M.Y., Puckova V.V., J. Org. Chem. USSR (Engl. Transl.) 1869, 5, 361

c) Beide Isomere getrennt isoliert.

d) Ein Isomeres isoliert. In der Tabelle ist nur die Formel für das [1,2-b]-Isomere angegeben.

FIG. 4

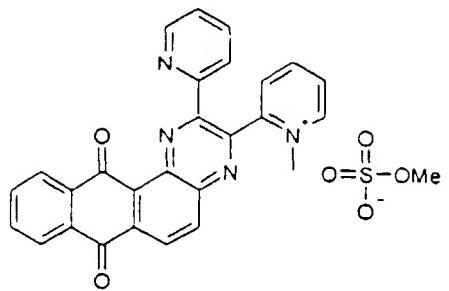


FIG. 5

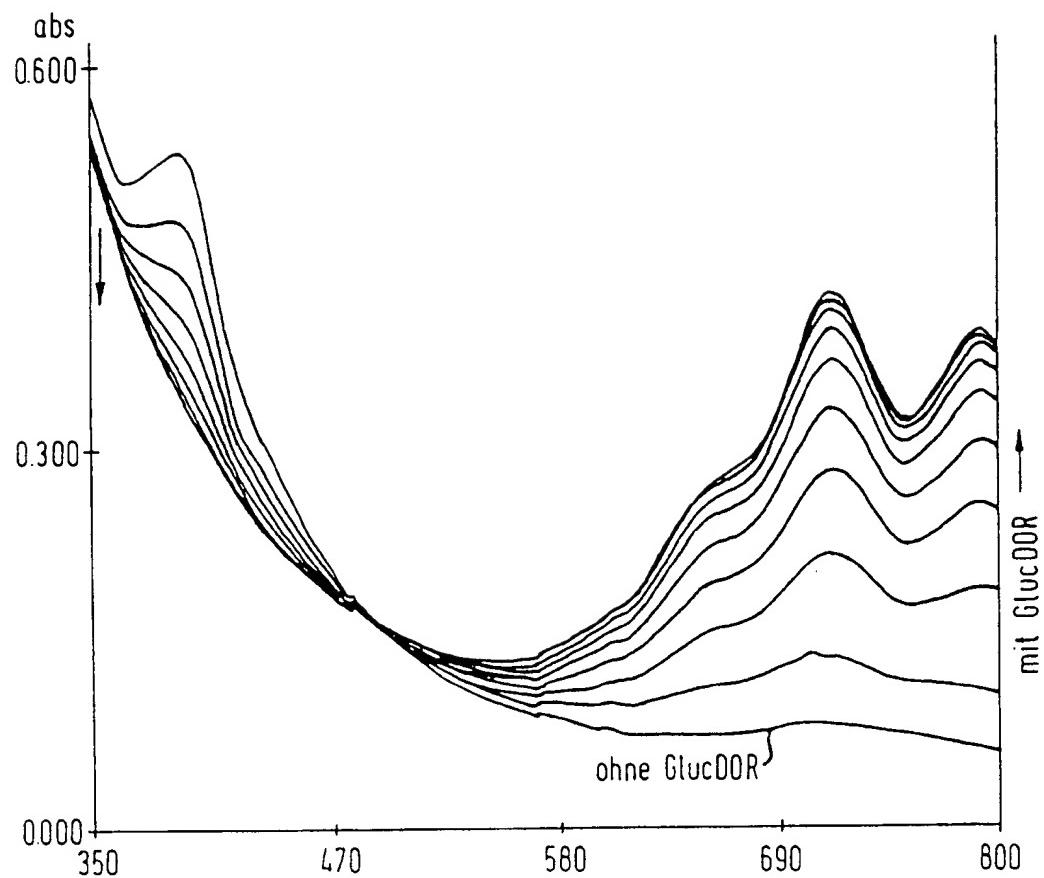


FIG. 6

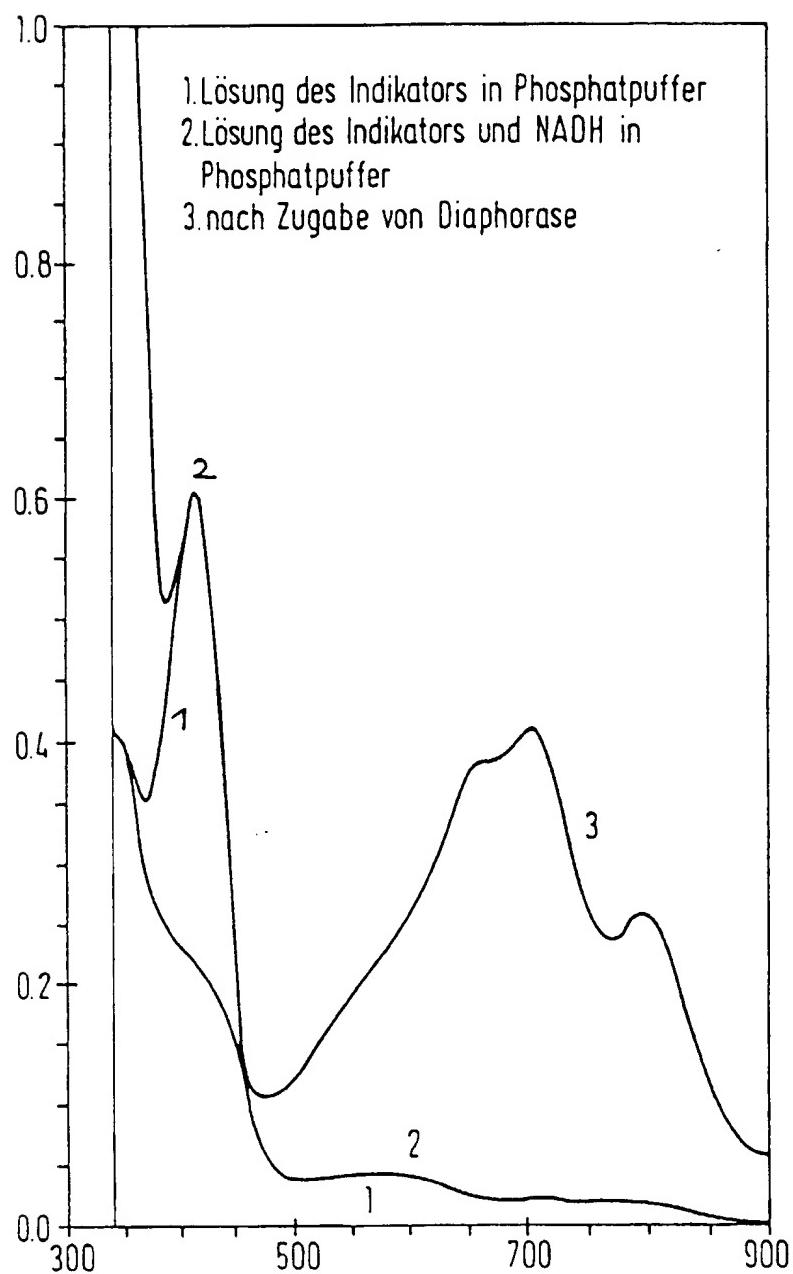


FIG. 7

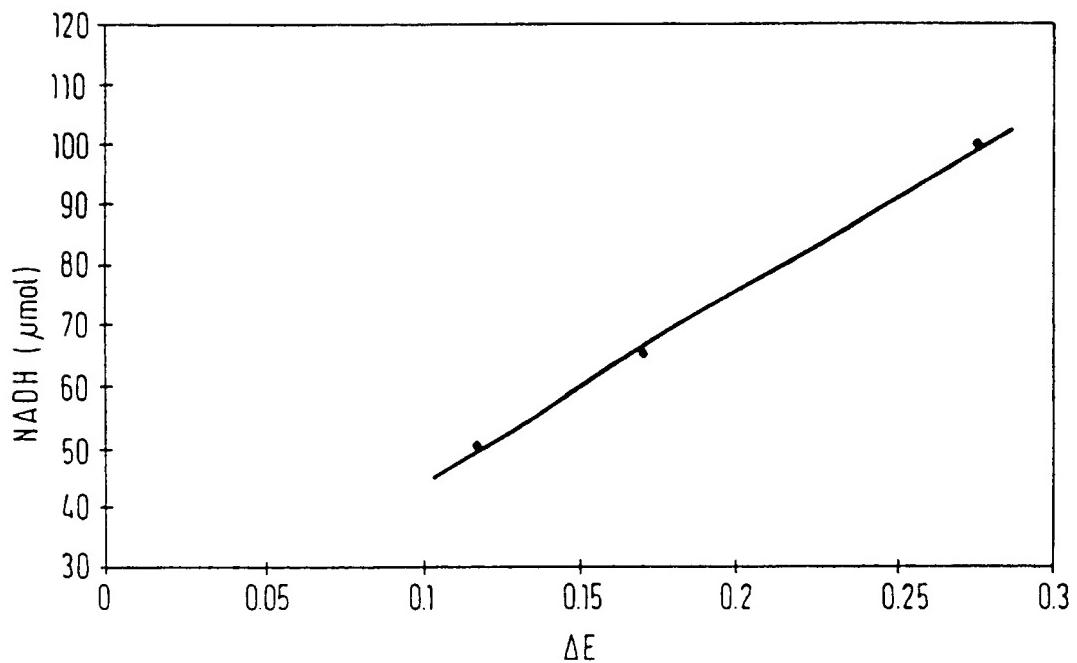


FIG. 8

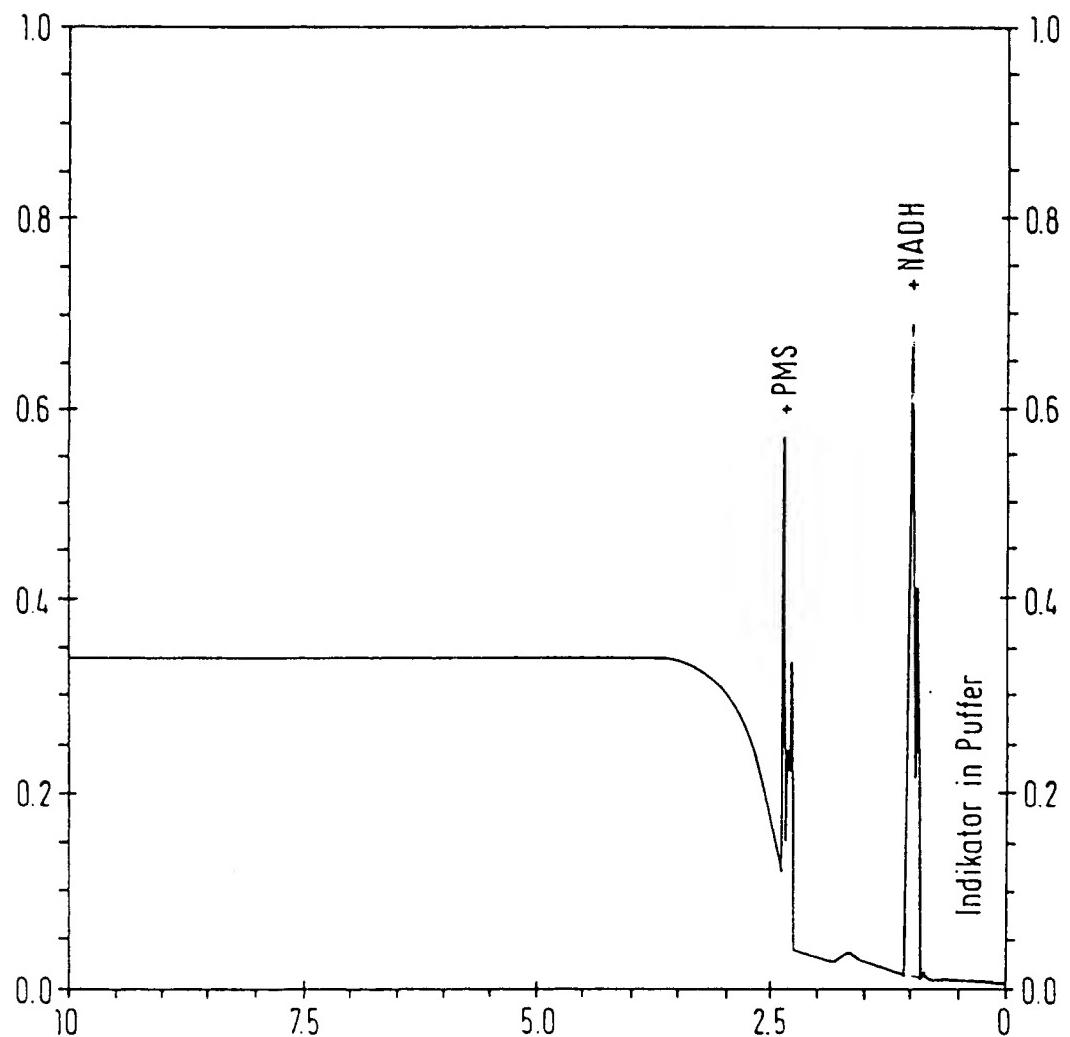


FIG. 9

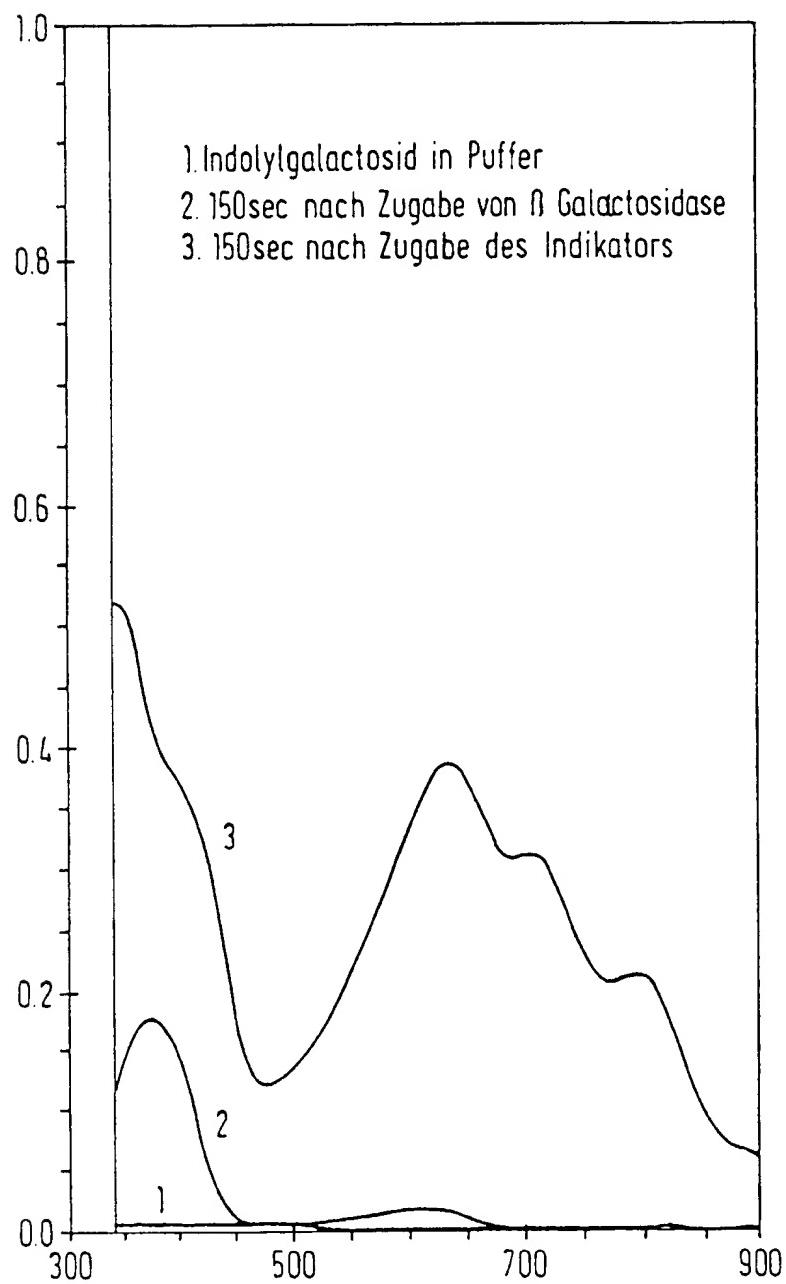
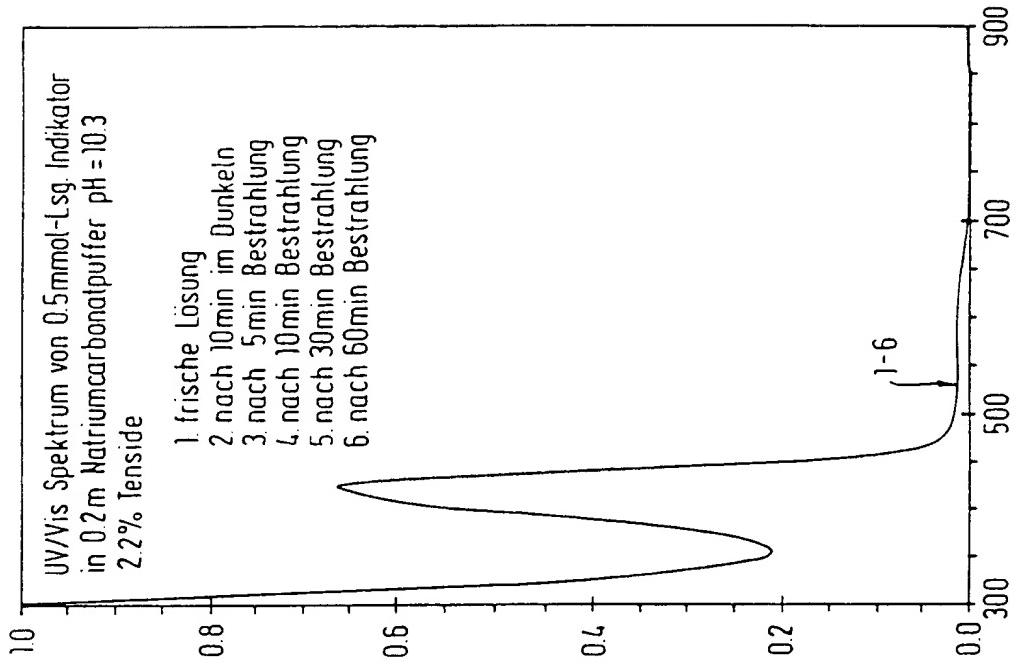
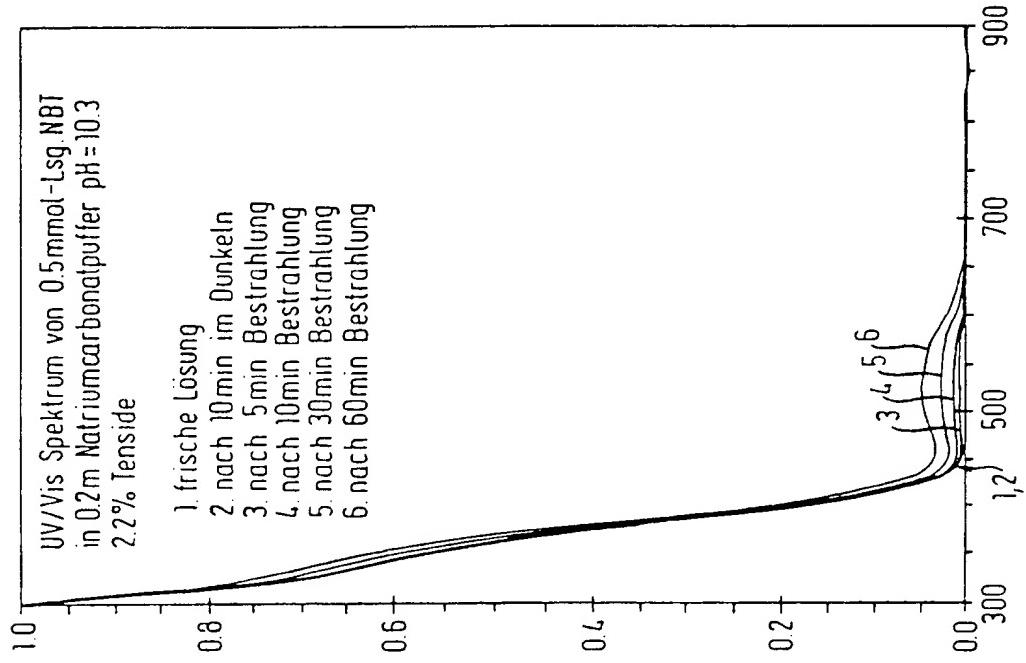


FIG. 10





Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 97 11 6653

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE					
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Befristt Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)		
X	SHETTY, P. S. ET AL: "Redox behavior of some vat dyes at the dropping mercury electrode" INDIAN J. CHEM. (1966), 4(8), 340-3 CODEN: IJOCAP. 1966, XP002052080 * Abbildungen VIIA.-, VIIIB * * das ganze Dokument *	22-29	G01N31/22 G01N33/52 C12Q1/26 C07D241/38 C07D401/14		
Y	---	1-29			
X	DE 20 16 365 A (CIBA AG.) 29.Oktober 1970	22-28			
Y	* das ganze Dokument *	1-29			
---	---	---			
X	EP 0 457 721 A (CIBA GEIGY AG) 21.November 1991	22-29			
Y	* das ganze Dokument *	1-29			
---	---	---			
X	CLARK, MALCOLM COLIN: "Chemistry of indanthrone. XIII. Constitution of indanthenes B" J. CHEM. SOC. C (1967), (10). 936-42 CODEN: JSOOAX, 1967, XP002052081 * Abbildungen *	22-29			
---	---	-/-			
RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6)					
G01N C12Q C07D					
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt					
Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer			
DEN HAAG	14.Januar 1998	Hoekstra, S			
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE					
X von besonderer Bedeutung allein betrachtet	T der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze				
Y von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie	E älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nur in dem Anmeldeatum veröffentlicht worden ist				
A technologischer Hintergrund	D in der Anmeldung angeführtes Dokument				
O nichtschriftliche Offenbarung	E als weiteren Grundlage angeführtes Dokument				
P Zwischenliteratur	S Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument				



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 97 11 6653

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betreff Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 93, no. 15. 1980 Columbus, Ohio, US: abstract no. 150211d. SHAPKIN, V.P. ET AL.: "Synthesis of naphto[2,3-a]phenazine derivatives." Seite 716; Spalte 1: XP002052086 * Zusammenfassung; Abbildung III * & SHAPKIN, V.P. ETAL.: "Synthesis of Naphto[2,3-a]phenazine derivatives." ZH. ORG. KHIM.. Bd. 16, Nr. 5, 1980, Seite 1104 * Zusammenfassung *	22-29	
X	LOPEZ B., ROSA ET AL: "Synthesis of a new phenanthroline derived ligand with acceptor properties" TETRAHEDRON LETT. (1996), 37(31), 5437-5440 CODEN: TELEAY:ISSN: 0040-4039. 1996, XP002052082 * das ganze Dokument; Abbildungen *	22-29	
X	A. STREITWEISER & C.H. HEATHCOCK: "Introduction to organic chemistry" 1976, MACMILLAN PUBLISHING CO., INC. NEW YORK XP002052085 * Seite 1149; Abbildungen *	22-29	
		-/-	
<p>Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt</p>			
Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer	
DEN HAAG	14. Januar 1998	Hoekstra, S	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			
<input checked="" type="checkbox"/> von besonderer Bedeutung allein betrachtet <input checked="" type="checkbox"/> von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie <input type="checkbox"/> technologischer Hintergrund <input type="checkbox"/> nichtschriftliche Offenbarung <input type="checkbox"/> Zwischenliteratur			
T: der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E: älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldeatum veröffentlicht worden ist D: in der Anmeldung angeführtes Dokument L: auf anderen Gründen angeführtes Dokument <input checked="" type="checkbox"/> Mitglied der gleichen Patentfamilie übereinstimmendes Dokument			



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 97 11 6653

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betreff Anspruch	
P, X	JP 08 245 596 A (MITSUI TOATSU CHEM INC) 24. September 1996 (1) and (2) * Abbildungen * & DATABASE WPI Week 9648 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 96-482218 "preparation of 3,3'-di:chloro-indanthrone useful as dye - by reduction and working up prod. in presence of anionic surfactant" & JP 08 245 596 (MITSUI TOATSU CHEM INC), 24. September 1996 * Zusammenfassung *	22-29	
P, X	AROUNAGUIRI, S. ET AL.: "Redox activated luminescence and light-induced nuclease activity of a new mixed-ligand ruthenium(II) complex" PROC. INDIAN ACAD. SCI. (CHEM. SCI.), Bd. 109, Nr. 2, April 1997, Seiten 155-158. XP002052083 * Abbildung 1 *	22-29	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6)
A	DE 26 40 695 A (BEHRINGWERKE AG) * das ganze Dokument *	1-29	
A	S.G. DIKALOV ET AL.: "Role of quinone-Iron(III) interaction in NADPH-dependen enzymatic generation of hydroxyl radicals" BIOCHEMISTRY, Bd. 31, 1992, Seiten 8947-8953. XP002052084 * das ganze Dokument *	1-29	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Rechercheur	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer	
DEN HAAG	14. Januar 1998	Hoekstra, S	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE		T der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D in der Anmeldung angeführtes Dokument L aus anderen Gründen angeführtes Dokument S Mitglied der gleichen Patentfamilie übereinstimmendes Dokument	
X von besonderer Bedeutung allein betrachtet			
Y von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie			
A technologischer Hintergrund			
O rechtliche Überarbeitung			
P Zwischenliteratur			

EPO/CEMM/POL/OSPEC (V4.0/04)